

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年9月13日 (13.09.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/66736 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/12, C07K 14/78, 16/18 (71) 出願人 および
(72) 発明者: 高橋健一 (TAKAHASHI, Kenichi) [JP/JP]; 〒
(21) 国際出願番号: PCT/JP01/01871 655-0854 兵庫県神戸市垂水区桃山台1-16 JCRコート
310 Hyogo (JP).
(22) 国際出願日: 2001年3月9日 (09.03.2001) (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 高井義美 (TAKAI,
(25) 国際出願の言語: 日本語 Yoshimi) [JP/JP]; 〒651-2102 兵庫県神戸市西区学園東
町2丁目5番地の73 Hyogo (JP). 中西宏之 (NAKANISHI,
(26) 国際公開の言語: 日本語 Hiroyuki) [JP/JP]; 〒651-2103 兵庫県神戸市西区学園
西町2丁目5番地の110 Hyogo (JP). 佐藤啓子 (SATO,
(30) 優先権データ: Keiko) [JP/JP]; 〒651-2112 兵庫県神戸市西区大津和2
丁目8番地の9 シティーガーデン神戸伊川谷302 Hyogo
特願2000-065595 2000年3月9日 (09.03.2000) JP (JP).
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術
振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY
CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本
町4丁目1番8号 Saitama (JP).
(74) 代理人: 弁理士 西澤利夫 (NISHIZAWA, Toshio); 〒
150-0042 東京都渋谷区宇田川町37-10 麻仁ビル6階
Tokyo (JP).
(81) 指定国 (国内): CA, US.

[続葉有]

(54) Title: PROTEINS NECTIN-3

(54) 発明の名称: 蛋白質ネクチン-3

(57) Abstract: Proteins nectin-3 having the amino acid sequences represented by SEQ ID NOS:2, 4 and 6 which are novel proteins belonging to the nectin protein family participating in the adhesion between cells; polynucleotides encoding these proteins nectin-3 and having the base sequences respectively represented by SEQ ID NOS:1, 3 and 5; recombinant vectors having these polynucleotides; and antibodies against the above-described proteins nectin-3. The proteins nectin-3 not only provide important information in clarifying the whole molecular mechanism of cell adhesion but potentially relate to the clarification of, for example, the infiltration and metastasis mechanisms of cancer, thereby being useful in diagnosing the malignancy of cancer, developing methods of preventing and treating the same and remedies, etc. therefor.

(57) 要約:

この出願は、細胞-細胞間接着結合に関与するネクチン蛋白質ファミリーに属する新規な蛋白質として、配列番号2、4または6のアミノ酸配列を有する蛋白質ネクチン-3を提供する。また、ネクチン-3をコードし、配列番号1、3、5の塩基配列をそれぞれ有するポリヌクレオチド、これらのポリヌクレオチドを保有する組換えベクター、並びに前記の蛋白質ネクチン-3に対する抗体を提供する。蛋白質ネクチン-3は、細胞結合の分子機構の全容を解明するための重要な情報を提供するばかりか、例えば癌腫の浸潤、転移のメカニズムの解明につながる可能性もあり、癌腫の悪性度の診断やその予防・治療法、治療薬等の開発に有用である。

WO 01/66736 A1



(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

明細書

蛋白質ネクチン-3

5

技術分野

この出願の発明は、カドヘリン (cadherin) を介した細胞接着結合に関与する新規な蛋白質ネクチン-3 と、これらの蛋白質を取得、利用するための遺伝子工学材料等に関するものである。

10

背景技術

動物個体における様々な細胞現象、例えば、細胞接着、細胞運動および細胞の形状決定等においては、細胞接着分子、受容体およびチャンネル等の膜貫通蛋白質によって形成される接着装置が重要な役割を果たしている。なかでも細胞の接着結合 (adherens junction: AJ) は、組織の整合性を維持するのに欠くことのできない役割を担っている。このような機能的役割に加えて、AJ は細胞増殖や組織の形態形成のコントロールに関わっているという証拠が増えてきている。また、多くの F-アクチン結合タンパク質がアクチン細胞骨格を接着分子に連結するリンカーの役目を果たしていることが明らかにされてきている。しかしながら AJ の分子的な理解は不十分であり、どのような分子がアクチン細胞骨格を細胞膜に結合させているかは明らかではなかった。

25 この点を明らかにするため、この出願の発明者等は、ラットの脳から幾つかの新規な F-アクチン結合蛋白質を単離し、特に神経細胞に特異的で、シナプスに多く存在する蛋白質の構造を解析し、「ニューラビン」 (neurabin) と命名して既に特許出願している (特開平 10-276784 号公報)。さらにこの出願の発明者等は、新規の

F-アクチン結合タンパク質 I-アフアディン (afadin) と、この I-アフアディンと結合する蛋白質ポンシンをそれぞれ単離し、特許出願している (I-アフアディン: 特開平 11-89572 号公報、ポンシン: 特願平 11-174687 号)。そしてさらに、この出願の発明者等は、カドヘリンを介した AJ 形成に対してアフアディンとともに機能する新規な蛋白質としてネクチン (nectin) -1 α 、-1 β およびネクチン-2 α 、-2 δ を特定している (J. Cell Biol. 145:539-549, 1999)。これらのネクチン-1、2 は、Ca²⁺ 非依存性の免疫グロブリン様接着分子であり、アフアディンおよびポンシンとともに、AJ 形成に 1 つの系として作用することを見出している (Genes Cells 4:573-581, 1999; J. Biol. Chem. 275:613-618, 2000)。

10

細胞接着の分子機構を解明することは、例えば、癌腫の浸潤、転移のメカニズムの解明につながる可能性があり、癌腫の悪性度の診断やその治療法、治療薬等の開発への応用も期待される。そして、そのような解明のためには、細胞接着に関与する分子の全貌を明らかにする必要がある。

15

この出願の発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであって、細胞-細胞間接着結合に関与する新規な蛋白質を提供することを課題としている。

また、この発明は、この蛋白質を遺伝子工学的に生産するための材料を提供することも課題としている。

20

発明の開示

この出願は、上記の課題を解決するものとして、配列番号 2、4 および 6 のそれぞれのアミノ酸配列を有する蛋白質ネクチン-3 を提供する。

この蛋白質ネクチン-3 は、マウス由来の蛋白質であって、マウスのゲノム遺伝子から発現される 3 種類のスプライシングバリエントである (以下、それぞれネク

チン-3 α 、ネクチン-3 β 、ネクチン-3 γ と記載する)。

この出願は、また、前記発明の蛋白質ネクチン-3 をコードするポリヌクレオチドを提供する。このポリヌクレオチドには、ゲノム DNA、mRNA、cDNA 等が含ま
5 れる。

この出願は、さらに、3種類のネクチン-3 をコードする cDNA として、配列番号1、3 および5のそれぞれの塩基配列を有するポリヌクレオチドを提供する。

10 さらにこの出願は、前記発明)のいずれかのポリヌクレオチドを保有する組換えベクターを提供する。

またこの出願は、前記の3種類の蛋白質ネクチン-3のいずれかに対する抗体を提供する。

15

なお、この発明のネクチン-3 は、ネクチン-1 およびネクチン-2 と同様に、全ての哺乳動物に共通して存在する蛋白質であることから、前記の蛋白質ネクチン-3、およびこれらをコードするポリヌクレオチドはマウス由来のものに限定されるものではない。

20

図面の簡単な説明

図1は、ネクチン-3 α 、-2 β および-3 γ のアミノ酸配列の比較図である。
25 背景黒領域は3つのバリエーションでの共通配列、背景灰色領域はネクチン-3 β と-3 γ での共通配列、下線はシグナルペプチド、2重下線は膜貫通領域、星印はアスパラギンのグリコシル化部位を示す。

図2は、ネクチン-3 α の trans homo-interaction を確認した結果である。(A)

はネクチン-3 α の発現レベルであり、細胞の溶出物を SDS-PAGE に展開し、抗ネクチン-3 α ポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロット分析した。(B) は細胞凝集活性であり、○は親 L 細胞株、●はネクチン-3 α 発現 L 細胞株である。

(C) は細胞凝集活性であり、C 1 は親 L 細胞株、C 2 はネクチン-2 α 発現 L 細胞株である。バーは 100 μ m を示す。

図 3 は、ネクチン-3 α の cis homo-dimer 形成を確認した結果である。ネクチン-3 α 発現細胞を B S 3 の存在下または非存在下でインキュベートし、各細胞溶出物を SDS-PAGE に展開し、抗ネクチン-3 α ポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロット分析した。矢印は単量体、矢頭は 2 量体を示す。

10 図 4 は、混合細胞凝集活性を調べた結果である。A 1 - A 3 は標識化ネクチン-1 α 発現 L 細胞株と非標識化ネクチン-2 α は発現 L 細胞株；B 1 - B 3 は標識化ネクチン-3 α 発現 L 細胞株と非標識化ネクチン-1 α 発現 L 細胞株；C 1 - C 3 は標識化ネクチン-3 α 発現 L 細胞株と非標識化ネクチン-2 α 発現 L 細胞株；A 1、B 1、C 1 は干渉コントラスト顕微鏡画像；A 2、B 2、C 2 は蛍光顕微鏡画像；A 3、B 3、C 3 は統計分析の結果である。バーは 40 μ m を示す。

図 5 は、2 種類の L 細胞株の共培養の免疫蛍光顕微鏡画像である。A 1 - A 3 はネクチン-1 α 発現 L 細胞株と-2 α 発現 L 細胞株；B 1 - B 3 はネクチン-3 α 発現 L 細胞株と-1 α 発現 L 細胞株；C 1 - C 3 はネクチン-3 α 発現 L 細胞株と-2 α 発現 L 細胞株；A 1、B 2 はネクチン-1 α ；A 2、C 2 はネクチン-2 α ；B 1 はネクチン-3 α (モノクローナル抗体)；C 1 はネクチン-3 α (ポリクローナル抗体)；A 3、B 3、C 3 は併用染色である。バーは 10 μ m を示す。

図 6 は、trans hetero-interaction の親和性を確認した結果であり、2 細胞凝集の組成 (標識化細胞と陽標識化細胞) を定量的に分析した。A は標識化ネクチン-1 α 発現 L 細胞株と非標識化ネクチン-2 α 発現 L 細胞株；B は標識化ネクチン-3 α 発現 L 細胞株と非標識化ネクチン-1 α 発現 L 細胞株；C は標識化ネクチン-3 α 発現 L 細胞株と非標識化ネクチン-2 α 発現 L 細胞株である。

図 7 は、ネクチン-3 α とネクチン-1 α または-2 α との cis hetero-dimer 形成を調べた結果である。A は cis dimer 形成の比較である。A 1 はネクチン-1 α 発現

L細胞株（レーン1）と-1 α /3 α 発現L細胞株（レーン2）；A2はネクチン-2 α 発現L細胞株（レーン1）と-2 α /3 α 発現L細胞株（レーン2）である。Bは免疫沈降の結果であり、B1はネクチン-1 α /3 α 発現L細胞株、B2はネクチン-2 α /3 α 発現L細胞株、レーン1は細胞抽出物、レーン2は上清、レーン3は沈殿物である。矢印は単量体、矢頭は2量体である。

図8は、ネクチン-3の組織分布を調べた結果である。Aはネクチン-1、-2および-3のノーザンブロット分析の結果であり、A1はネクチン-1；A2はネクチン-2；A3はネクチン-3である。Bはネクチン-3 α 、-3 β および-3 γ のノーザンブロット分析の結果であり、B1はネクチン-3 α 、B2はネクチン-3 β 、B3はネクチン-3 γ である。レーン1は心臓、レーン2は脳、レーン3は脾臓、レーン4は肺、レーン5は肝臓、レーン6は骨格筋、レーン7は腎臓、レーン8は精巣である。

図9は、マウス小腸吸収上皮におけるネクチン-3 α の細胞内局在を調べた結果である。Aはネクチン-3 α ；Bはネクチン-2；Cは併用である。星印は小腸の内部空間を示す。バーは10 μ mである。

図10は、アフアディンとネクチン-3 α との直接的な結合を調べた結果である。矢印は融合蛋白質 GST-nectin-3 α -CP、矢頭は融合蛋白質 MBP-afadin-PDZを示す。

20 発明を実施するための最良の形態

マウス蛋白質ネクチン-3 α は、配列番号1に塩基配列を示した1650bpのcDNAにコードされた蛋白質であり、配列番号2に示した549のアミノ酸配列を有している。また、このネクチン-3 α の全cDNAは、配列番号7に示した2178bpの塩基配列を有している。

ネクチン-3 β は、配列番号3に塩基配列を示した1533bpのcDNAにコードされた蛋白質であり、配列番号4に示した510のアミノ酸配列を有している。

ネクチン-3 γ は、配列番号5に塩基配列を示した1317bpのcDNAにコードされた蛋白質であり、配列番号6に示した438のアミノ酸配列を有している。

- 5 これらの蛋白質ネクチン-3は公知の方法により、マウスやその他の哺乳動物組織から単離する方法、この発明によって提供されるアミノ酸配列に基づき化学合成によってペプチドを調製する方法、あるいは発明によって提供されるポリヌクレオチドを用いて組換えDNA技術で生産する方法などにより取得することができる。例えば、組換えDNA技術によってネクチン-3を取得する場合には、ネクチン-3を
- 10 コードするポリヌクレオチドを有するベクターからインビトロ転写によってRNAを調製し、これを鋳型としてインビトロ翻訳を行なうことによりインビトロで発現できる。また各ポリヌクレオチドを公知の方法により適当な発現ベクターに組換えれば、大腸菌、枯草菌、酵母、動植物細胞等で、ポリヌクレオチドがコードするネクチン-3を大量に発現させることができる。

15

- この発明の蛋白質ネクチン-3を大腸菌などの微生物で発現させる場合には、微生物中で複製可能なオリジン、プロモーター、リボソーム結合部位、DNAクローニング部位、ターミネーター等を有する発現ベクターに、この発明のポリヌクレオチドを挿入結合して組換えた発現ベクターを作成し、この発現ベクターで宿主細胞を
- 20 形質転換したのち、得られた形質転換体を培養すれば、ポリヌクレオチドがコードしているネクチン-3を微生物内で大量生産することができる。あるいは、他の蛋白質との融合蛋白質として発現させることもできる。得られた融合蛋白質を適当なプロテアーゼで切断することによって、ポリヌクレオチドがコードする蛋白質部分のみを取得することもできる。

25

この発明の蛋白質ネクチン-3を動物細胞で発現させる場合には、この発明のポリヌクレオチドを、動物細胞用プロモーター、スプライシング領域、ポリ(A)付加部位等を有する動物細胞用発現ベクターに組換え、動物細胞内に導入すれば、この発

明の蛋白質ネクチン-3を動物細胞内で発現できる。

以上のとおり方法によって得られるマウス蛋白質ネクチン-3は、例えば、この蛋白質を特異的に認識する抗体を作成するための抗原として使用することができる。

5

蛋白質ネクチン-3には、配列番号2、4または6で表されるアミノ酸配列のいかなる部分アミノ酸配列を含むペプチド断片（5アミノ酸残基以上）も含まれる。これらのペプチド断片もまた抗体を作製するための抗原として用いることができる。

10 この発明のポリヌクレオチドは、前記の蛋白質ネクチン-3 α 、 β および γ をコードする哺乳動物のゲノム遺伝子であって、例えば、配列番号1、3または5の塩基配列を有するポリヌクレオチドまたはその一部配列をプローブとして、既存のゲノムライブラリー等から単離することができる。

15 この発明のポリヌクレオチドはまた、配列番号1、3または5で表される塩基配列を有することを特徴とする cDNA であり、前記ネクチン-3 α 、 β および γ をそれぞれコードしている。これらのポリヌクレオチドは、配列番号1、3または5の塩基配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドプローブを用いて、マウスやその他の哺乳動物 cDNA ライブラリーをスクリーニングすることにより、この発明のポリ
20 リヌクレオチドと同一のクローンを容易に得ることができる。あるいは、これらのオリゴヌクレオチドをプライマーとして、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法を用いて、目的ポリヌクレオチドを合成することもできる。

25 一般に哺乳動物の遺伝子は個体差による多型が頻繁に認められる。従って配列番号1、3または5において、1または複数個のヌクレオチドの付加、欠失および／または他のヌクレオチドによる置換がなされているポリヌクレオチドもこの発明に含まれる。同様に、これらの変更によって生じる1または複数個のアミノ酸残基の付加、欠失および／または他のアミノ酸残基による置換がなされている蛋白質も、

配列番号 2、4 または 6 で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質の活性を有する限り、この発明に含まれる。

この発明のポリヌクレオチドには、配列番号 1、3 または 5 で表される塩基配列
5 のいかなる部分塩基配列を含む DNA 断片 (10bp 以上)、あるいはそれらのアンチセンス鎖からなるポリヌクレオチドも含まれる。

この発明の抗体は、蛋白質ネクチン-3 それ自体、またはその部分ペプチドを抗原として、公知の方法により、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体として得ることができる。
10

以下、実施例として、この発明のネクチン-3 の構造とその機能確認について行った実験結果を示す。

15

実施例

1. 方法

20 1. 1 マウス・ネクチン-3 cDNA の分子クローニング

EST データベースから、ネクチン-1 および-2 に類似しているが、同一ではない 3 種類のマウス EST クローン (A11428160, AA492633, AA497887) をマウス脳 cDNA (Clontech 社) から PCR 増幅した。これら cDNA 混合物をプローブとして用いてマウス cDNA ライブラリー (Stratagene 社) をスクリーニングし、全長 cDNA
25 を得た。塩基配列の決定は、DNA sequencer (ABI 373) を用いて行った。

1. 2 ネクチン-3 発現ベクターの構築

ベクター pCAGIPuro (J. Biol. Chem. 275:613-618, 2000)、pCAGIPuro-FLAG、

pGEX-KG (Anal. Biochem. 192:262-267, 1991)、pMal-C2 (New England Biolabs Inc.) および pFastBac1-Msp-Fc (J. Cell Biol. 145:539-549, 1999) を用いて以下のネクチン-3 発現ベクターを構築した。なお、pCAGIPuro-FLAG は、prepro-trypsin シグナルペプチドと pFLAG-CMV1 (Eastman Kodak Co.) の FLAG エピトープを
5 pCAGIPuro にサブクローニングすることによって作成した。

- (a)pCAGIPuro-nectin-3 α : 配列番号 2 の 1-549 (全長)
- (b)pCAGIPuro-FLAG-nectin-3 α : 配列番号 2 の 56-549
- (c)GST-nectin-3 α -CP : 配列番号 2 の 433-549 (細胞質領域)
- 10 (d)GST-nectin-3 α -CP- Δ C : 配列番号 2 の 433-545 (C 端 4 アミノ酸残基の欠失)
- (e)GST-nectin-3 γ -CP : 配列番号 6 の 397-438 (細胞質領域)
- (f)pFastBac1-Msp-Fc-nectin-3 α -EX : 配列番号 2 の 56-400 (細胞外領域)

1. 3 形質転換体細胞の構築

- 15 L 細胞 (京都大学より入手) を 10%ウシ胎児血清含有の DMEM 培地で培養し、形質転換 L 細胞を作成した。全長ヒト・ネクチン-1 α を発現する L 細胞株 (nectin-1 α -L cells) または全長マウス・ネクチン-2 α を発現する L 細胞株 (nectin-2 α -L cells) は、それぞれ文献 (J. Cell Biol. 145:539-549, 1999, J. Biol. Chem. 275:613-618, 2000) に記載の方法で作成した。全長マウス・ネクチン-3 α
20 を発現する L 細胞株 (nectin-3 α -L cells) は、組換え体ベクター pCAGIPuro-nectin-3 α を用いて作成した。ネクチン-1 α と FLAG-ネクチン-3 α を共に発現する細胞株 (nectin-1 α /3 α -L cells)、またはネクチン-2 α と FLAG-ネクチン-3 α を共に発現する細胞株 (nectin-2 α /3 α -L cells) は、それぞれ、細胞株 (nectin-1 α -L cells および nectin-2 α -L cells) に、Lipofectamine reagent (GIBCO BRL) を用いて、
25 pCAGIPuro-FLAG-nectin-3 α をトランスフェクションすることによって作成した。各細胞株は、1 日培養後、培地を交換し、5 μ g/ml の puromycin (Sigma Chemical Co.) によって選択した。

1. 4 抗体の作成

ネクチン-3 α に対するウサギ抗血清（ポリクローナル抗体）を、GST-nectin-3 α -CP を抗原として作成した。ネクチン-3 に対するラットモノクローナル抗体は、ネクチン-3 α の細胞外領域と IgG Fc との融合蛋白質を抗原として作成した。ウサギ抗ネクチン-1 α ポリクローナル抗体は文献（J. Cell Biol. 145:539-549, 1999）に記載の方法で作成した。また、ネクチン-1 α のアミノ酸位置 450-468 に対応する合成ペプチドを抗原としてウサギ抗ネクチン-1 α ポリクローナル抗体を文献（J. Cell Biol. 145:539-549, 1999）に記載の方法により作成した。さらに、ラット抗ネクチン-2 モノクローナル抗体を文献（J. Cell Biol. 145:539-549, 1999, Exp. Cell Res. 235:374-384, 1997）に記載の方法で、また、マウス・モノクローナルおよびウサギ・ポリクローナル抗トアファディン抗体を文献（J. Cell Biol. 139:517-528, 1997, Oncogene 18:1609-1618, 1999）に記載の方法で作成した。ラット抗 E-カドヘリンモノクローナル抗体は竹市博士（京都大学）から供与された。マウス抗 FLAG モノクローナル抗体は Eastman Kodak より購入した。

15

1. 5 その他の方法

細胞凝集アッセイ（Cell Aggregation Assay）は、文献（J. Cell Biol. 145:539-549, 1999, J. Biol. Chem. 275:613-618, 2000）に記載の方法に従って行った。また、2 種類の L 細胞株間での混合細胞凝集アッセイは、文献（J. Cell Biol. 103:171-187, 1986）の記載に従い、一方の L 細胞株を Dil（Molecular Probe Inc. USA）によって事前標識して行った。

化学的交叉結合（Chemical Cross-linking）は、文献（Blood 92:4602-4611, 1998, J. Biol. Chem. 275:613-618, 2000）に記載の方法に従って行った。免疫沈降（Immunoprecipitation）は、文献（J. Cell Biol. 145:539-549, 1999, J. Biol. Chem. 275:613-618, 2000）に記載の方法に従って行った。培養細胞の免疫蛍光顕微鏡観察は、文献（J. Cell Biol. 139:517-528, J. Cell Biol. 145:539-549, 1999, J. Biol. Chem. 275:613-618, 2000）に記載の方法に従って行った。蛋白質濃度の測定は、文献（Anal. Biochem. 72:248-254, 1976）の記載に従って、ウシ血清アルブミンを対照と

25

する方法により行った。SDS-PAGE は文献 (Nature 227:680-685, 1970) の記載に従って行った。

また、アフィニティークロマトグラフィーは以下のとおりに行った。アフアディン PDZ ドメインの MBP 融合蛋白質は amylose resin beads (New England Biolabs Inc.) に固定化した。GST-nectin-3 α -CP および GST-nectin-3 α -CP- Δ C はそれぞれアフィニティービーズに固定化した。これらのビーズを PBS (0.1% Triton X-100 含有) で十分に洗浄した後、PBS (20 mM maltose, 0.1% Triton X-100 含有) により溶出した。

10 2. 結果

2. 1 ネクチン-3 cDNA のクローニングとその特徴

マウス cDNA ライブラリーから得られた cDNA クローンは、配列番号 7 の塩基配列を有しており、1647bp からなる翻訳領域 (配列番号 1) に 549 アミノ酸配列 (配列番号 2) からなる蛋白質 (推定分子量 60,580) をコードしていた。また、このクローンは前記 EST クローンを全て含んでいた。この蛋白質をネクチン-3 α と命名した。

このネクチン-3 α のアミノ酸配列は、N 端疎水性シグナルペプチド (配列番号 2 の位置 1-55) および膜貫通領域 (配列番号 2 の位置 405-421) を有していた。

20 また、N 結合型グリコシル化は位置 73、83、125、186、222 および 331 に見られた。また、このネクチン-3 は、細胞外領域に 3 つの Ig 様ドメインを含んでおり、細胞質領域には C 端保存モチーフを有していた (表 1)。

表 1

C-Terminal sequences of the nectin family members	
5 Nectin-1 α	S F I S K K E W Y V
Nectin-1 β	V R T T E P R G E C
Nectin-2 α	S L I S R R A V Y V
Nectin-2 δ	D E F V S R A M Y V
10 Nectin-3 α	S V I S R R E W Y V
Nectin-3 β	L Y I N P R E H Y V
Nectin-3 γ	L G Q V R A L E D T

以上のとおりのネクチン-3 α の構造的な特徴は、ネクチン-1 α 、-1 β 、-2 α および-2 δ と類似している。ホモロジーの程度は領域によって異なるが、ネクチン-3 α の細胞外領域のアミノ酸配列は、ネクチン-1およびネクチン-2とそれぞれ35.9%および30.7%同一であった。

また、ネクチン-3 α を単離する過程で、2つのスプライシングバリエント（ネクチン-3 β および-3 γ ）が見出された。ネクチン-3 β の cDNA（翻訳領域）は20 1533bp の塩基配列（配列番号3）を有しており、510 のアミノ酸配列（配列番号4）からなる蛋白質（推定分子量 55,808）をコードしている。このネクチン-3 β の細胞外領域（配列番号4の位置1-357）はネクチン-3 α のそれと同一であるが、膜貫通領域および細胞質領域（配列番号4の位置 358-510）はネクチン-3 α とは異なっている。しかし、ネクチン-3 β はC端保存モチーフを有していた（表1）。

25 ネクチン-3 γ の cDNA（翻訳領域）は 1317bp の塩基配列（配列番号5）を有しており、438 のアミノ酸配列（配列番号6）からなる蛋白質（推定分子量 47,259）をコードしている。このネクチン-3 γ の細胞外領域、膜貫通領域および細胞質領域はネクチン-3 β と同一であるが、ネクチン-3 γ はC端保存モチーフを欠失し

ている（表1）。

図1は、以上のネクチン-3 α 、-3 β および-3 γ のアミノ酸配列（1文字記号）の比較図である。

なお、以下の実験では主としてネクチン-3 α を対象とする。その理由は、様々な組織を対象としたノーザンブロット分析の結果、ネクチン-3 α が主要なスプライシングバリエーションであることが確認されたからである（図8、B1-B3参照）。

2. 2 ネクチン-3 α の trans Homo-Interaction と cis Homo-dimer Formation

nectin-1 α -L cells および nectin-2 α -L cells を用いた研究により、ネクチン-1 α およびネクチン-2 α が細胞-細胞接着活性（trans Homo-Interaction）を示すことが確認されている（J. Cell Biol. 145:539-549, 1999、J. Biol. Chem. 275:613-618, 2000）。そこで先ず、ネクチン-3 α が同様の活性を有するか否かを調べた。抗ネクチン-3ポリクローナル抗体は、細胞株 nectin-3 α -L cells の発現産物について、分子量約 100 kDa の2つの蛋白質バンドを認識した（図2A、図3）。これらは、グリコシル化等の翻訳後修飾の違いによるものと考えられる。また、これらの分子量は、アミノ酸配列から推定される分子量とも異なるが、これもまたグリコシル化の相違によるものと考えられる。さらに、各細胞株におけるネクチン-1 α 、-2 α および-3 α の発現レベルは同等であった（データ示さず）。

次に、細胞株 nectin-3 α -L cells を用いてネクチン-3 α の細胞凝集活性を調べた。その結果、ネクチン-3 α は経時的に細胞凝集活性を示した（図2B、C1、C2）。この活性は EDTA 添加によって影響されないことから（データ示さず）、ネクチン-3 α の細胞-細胞接着活性はCa²⁺非依存性であることが確認された。以上の結果から、ネクチン-3 α は、ネクチン-1 α 、-2 α および-2 δ と同様（J. Cell Biol. 145:539-549, 1999、Exp. Cell Res. 235:374-384, 1997、Blood 92:4602-4611, 1998、J. Biol. Chem. 275:613-618, 2000）のCa²⁺非依存性のホモフィリックCAM（細胞接着分子）であることが確認された。

ネクチン-1 α および-2 α は cis homo-dimer を形成することが知られているので（J. Biol. Chem. 275:613-618, 2000）、ネクチン-3 α についても同様に活性につ

いて調べた。細胞株 nectin-3 α -L cells を単一細胞に分離し、細胞表面クロスリンカーBS3 と共にインキュベートし、抗ネクチン-3 α ポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロット分析を行った。その結果、2量体に対応する分子量約 200~220 kDa のバンドが確認された(図3)。また、より高分子量のバンドも検出された。

- 5 この交叉結合は単一細胞懸濁により行ったので、このダイマーやオリゴマーは trans homo-interaction よりも cis homo-interaction によるものである可能性が高い。

2. 3 ネクチン-3 α とネクチン-1 α または-2 α との trans Hetero-interaction

- ネクチンファミリーの各メンバーがヘテロフィリックな細胞-細胞接着活性
10 (trans hetero-interaction) を示すか否かを調べるため、混合細胞凝集アッセイを行った。Dil 標識された細胞株 nectin-1 α -L-cells が非標識 nectin-2 α -L-cells と混合された場合には、常に、標識細胞だけか、または非標識細胞だけが凝集し(図4A1-A3)、両方のL細胞株からなる凝集塊はほとんど検出されなかった。一方、Dil 標識された細胞株 nectin-3 α -L-cells が非標識細胞株 nectin-1 α -L-cells と混合された場
15 合には、標識細胞と非標識細胞とからなる凝集塊が観察された(図4B1-B3)。このことは、ネクチン-3 α がネクチン-1 α と trans hetero-interaction を形成することを示している。また、同様の結果が、ネクチン-3 α とネクチン-2 α についても得られた(図4C1-C3)。

- さらにこの結果を確認するため、免疫蛍光顕微鏡観察を行った。細胞株 nectin-1 α
20 -L-cells と細胞株 nectin-2 α -L-cells とを共培養した場合には、ネクチン-1 α とネクチン-2 α は、それぞれのL細胞株の細胞-細胞接触部位に局在していた(図5A1-A3)が、ネクチン-1 α およびネクチン-2 α は2つのL細胞株同士の接触部位には検出されなかった。一方、細胞株 nectin-3 α -L-cells と細胞株 nectin-1 α -L-cells とを共培養した場合には、ネクチン-3 α とネクチン-1 α は、2つのL細胞
25 株同士の接触部位に共存していた(図5B1-B3)。同様の結果は、細胞株 nectin-3 α -L-cells と細胞株 nectin-2 α -L-cells とを共培養した場合にも観察された(図5C1-C3)。これらの結果から、ネクチン-3 α はネクチン-1 α および-2 α と trans hetero-interaction を形成するが、ネクチン-1 α と-2 α はそのよう

な相互作用を示さないことが確認された。

次に、ネクチンファミリーの各メンバーが、trans homo-interaction を形成するか、あるいは trans hetero-interaction を形成するかを調べるため、混合細胞凝集アッセイを用いて2種類の細胞凝集を分析した。4細胞凝集の結果と同様に、細胞株 nectin-1
5 α -L-cells と細胞株 nectin-2 α -L-cells とを混合した場合には、ホモ型の2細胞凝集が形成された(図6A)。これに対して、細胞株 nectin-1 α -L-cells と細胞株 nectin-3 α -L-cells とを混合した場合にはヘテロ型の2細胞凝集が形成され、ホモ型の細胞凝集はほとんど観察されなかった(図6B)。同様の結果は、細胞株 nectin-3 α -L-cells と細胞株 nectin-2 α -L-cells とを混合した場合にも観察された(図6C)。以上
10 の結果から、ネクチン-3 α とネクチン-1 α または-2 α との trans hetero-interaction の親和性は、ネクチン-1 α 、-2 α または-3 α の trans homo-interaction の親和性より明らかに強いことが確認された。

2. 4 ネクチン-3 α とネクチン-1 α または-2 α との cis hetero-dimer 形成

15 ネクチン-3 α がネクチン-1 α または-2 α と cis hetero-dimer を形成するか否かを調べるため、細胞株 nectin-1 α /3 α -L cells および細胞株 nectin-2 α /3 α -L cells を用いて、FLAG-ネクチン-3 α をそれぞれ細胞株 nectin-1 α -L cells および細胞株 nectin-2 α -L cells で発現させた。その結果、FLAG-ネクチン-3 α は、ネクチン-1 α または-2 α の cis dimer のサイズを変えなかった(図7A1 およびA2)。細胞株 nectin-1 α /3 α -L cells に細胞表面交叉結合を行い、次いで抗 FLAG モノクロー
20 ナル抗体を用いて免疫沈降を行うと、ネクチン-1 α は上清中に回収され、FLAG-ネクチン-3 α とは共免疫沈降しなかった(図7B1)。同様の結果は細胞株 nectin-2 α /3 α -L cells においても得られた(図7B2)。以上の結果から、ネクチン-3 α は、ネクチン-1 α または-2 α とは cis hetero-dimer を形成しないことが確
25 認された。

2. 5 ネクチン-3 α の組織分布および細胞内局在

以前の報告(J. Virol. 66:2807-2813, 1992、Gene 155:261-265, 1995、Gene

159:267-272, 1995)と同様に、ノーザンブロット分析の結果からは、ネクチン-1は脳で優性に発現しており、ネクチン-2は全身性に発現していた(図8A1およびA2)。ネクチン-3の3種類のスプライシングバリエーションに共通な翻訳領域をプローブとして用いたノーザンブロット分析では、様々な組織において幾つかの
5 mRNAバンドが検出された(図8A3)。そこで、各バリエーションの組織分布を調べるために、各バリエーションに特異的なcDNAプローブを用いた。ネクチン-3 α は約5.2-kb、3.8-kb、3.3-kbおよび2.7-kbのmRNAバンドを示し、これらは精巣で有意に発現し、他の組織(心臓、脳、肺、肝臓および腎臓)では僅かに発現していた(図8B1)。ネクチン-3 β は約5.2-kbおよび3.3-kbのmRNAバンドを示し、こ
10 れらは精巣で発現していた(図8B2)。ネクチン-3 γ は精巣において約3.3-kbのmRNAバンドを示し、肺、肝臓および腎臓において2.1-kbのmRNAバンドを示した(図8B3)。

次に、ネクチン-3 α の細胞内局在を調べるため、抗ネクチン-3 α ポリクローナル抗体を用いて免疫蛍光顕微鏡観察を行った。ネクチン-3 α は、マウス小腸吸
15 収上皮の接着複合体領域にネクチン-2と共存していた(図9)。以上の結果から、ネクチン-2と同様に(J. Cell Biol. 145:539-549, 1999)、ネクチン-3 α もまたカドヘリン性細胞-細胞AJsに局在していることが示唆された。

2. 6 ネクチン-3とアフアディンとの直接結合

20 ネクチン-3 α がアフアディンと直接に結合するか否かを調べるため、アフィニティークロマトグラフィーを行った。ネクチン-3 α の細胞質領域のGST融合蛋白質(GST-nectin-3 α -CP)は、amylose resin beadsに固定化されたMBP-afadin-PDZ(アフアディンのPDZ領域とのMBP融合蛋白質)に結合した(図10)。ネクチン-3 α のアフアディンへの結合の化学量論は約1:1であった。これに対して、
25 細胞質領域のC端4アミノ酸残基を欠失したネクチン-3 α とのGST融合蛋白質(GST-nectin-3 α -CP- Δ C)は結合しなかった。同じく、C端の保存モチーフを欠失しているネクチン-3 γ の細胞質領域とのGST融合蛋白質もアフィニティーズとは結合しなかった。

産業上の利用可能性

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、ネクチン-1 および-2
5 と同一の蛋白質ファミリーに属する新規蛋白質ネクチン-3 が提供される。この蛋白質は、細胞結合の分子機構の全容を解明するための重要な情報を提供するばかりか、例えば癌腫の浸潤、転移のメカニズムの解明につながる可能性もあり、癌腫の悪性度の診断やその予防・治療法、治療薬等の開発に有用である。

請求の範囲

1. 配列番号 2 のアミノ酸配列を有する蛋白質ネクチン-3。
- 5 2. 配列番号 4 のアミノ酸配列を有する蛋白質ネクチン-3。
3. 配列番号 6 のアミノ酸配列を有する蛋白質ネクチン-3。
4. 請求項 1 から 3 のいずれかの蛋白質ネクチン-3 をコードするポリヌクレオ
10 チド。
5. 配列番号 1 の塩基配列を有する請求項 2 のポリヌクレオチド。
6. 配列番号 3 の塩基配列を有する請求項 2 のポリヌクレオチド。
15
7. 配列番号 5 の塩基配列を有する請求項 2 のポリヌクレオチド。
8. 請求項 4 から 7 のいずれかのポリヌクレオチドを保有する組換えベクター。
- 20 9. 請求項 1 から 3 のいずれかの蛋白質ネクチン-3 に対する抗体。

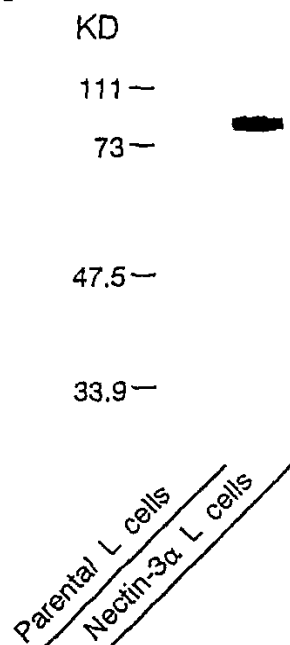
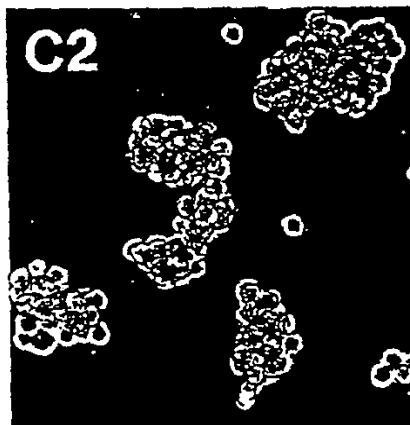
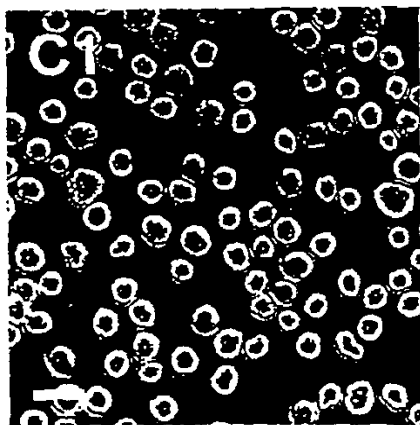
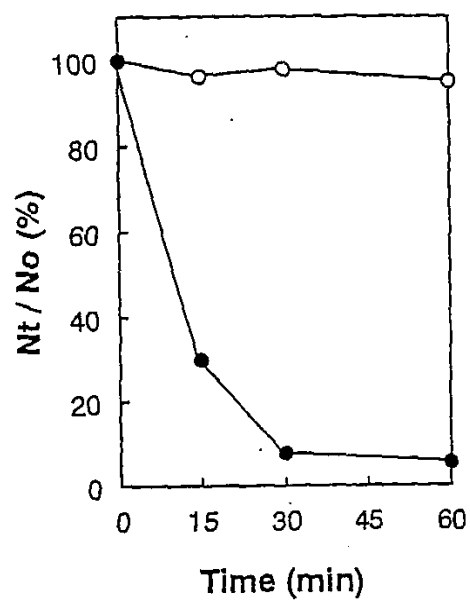
1/10

1

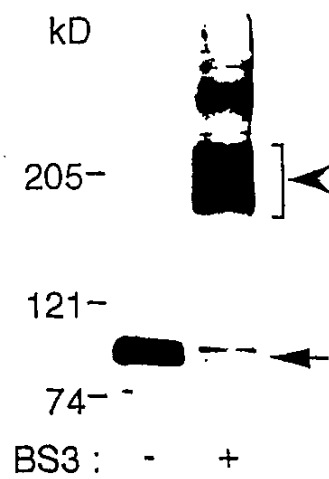
Nectin-3α	MARTPGPAPLCPGGGKAQLSSAFPPAAGLLLPAPTPPPLLLIPLLLFSRLCGALAGSI	60
Nectin-3β	MARTPGPAPLCPGGGKAQLSSAFPPAAGLLLPAPTPPPLLLIPLLLFSRLCGALAGSI	80
Nectin-3γ	MARTPGPAPLCPGGGKAQLSSAFPPAAGLLLPAPTPPPLLLIPLLLFSRLCGALAGSI	60
Nectin-3α	IVEPHVTA VWGKNVSLKCLIEVNETITQISWEKIHGKSTQTVAVHHPOYGFSVQGDYQGR	120
Nectin-3β	IVEPHVTA VWGKNVSLKCLIEVNETITQISWEKIHGKSTQTVAVHHPOYGFSVQGDYQGR	120
Nectin-3γ	IVEPHVTA VWGKNVSLKCLIEVNETITQISWEKIHGKSTQTVAVHHPOYGFSVQGDYQGR	120
Nectin-3α	VLFKNYSLNDATITLHNIGFSDSGKYICKAVTFPLGNAQSSITTVLVEPTVSLIKGRDS	180
Nectin-3β	VLFKNYSLNDATITLHNIGFSDSGKYICKAVTFPLGNAQSSITTVLVEPTVSLIKGRDS	180
Nectin-3γ	VLFKNYSLNDATITLHNIGFSDSGKYICKAVTFPLGNAQSSITTVLVEPTVSLIKGRDS	180
Nectin-3α	LIDGGNETVA AVCVAATGKPVAAQIDWEGDLGEMESSITTSFPNETATIVSQYKLFPTRFAR	240
Nectin-3β	LIDGGNETVA AVCVAATGKPVAAQIDWEGDLGEMESSITTSFPNETATIVSQYKLFPTRFAR	240
Nectin-3γ	LIDGGNETVA AVCVAATGKPVAAQIDWEGDLGEMESSITTSFPNETATIVSQYKLFPTRFAR	240
Nectin-3α	GRRITCVVVKHPALEKDIRYSFILDIOVAPEVSVTGYDGNWFVGRKGVNLCNADANPPPF	300
Nectin-3β	GRRITCVVVKHPALEKDIRYSFILDIOVAPEVSVTGYDGNWFVGRKGVNLCNADANPPPF	300
Nectin-3γ	GRRITCVVVKHPALEKDIRYSFILDIOVAPEVSVTGYDGNWFVGRKGVNLCNADANPPPF	300
Nectin-3α	KSVWSRLDGGQWPDGLLASDNTLHFVHPLTVNYSGVVVCVKSNSLGQRSDQKVYISDIPPT	360
Nectin-3β	KSVWSRLDGGQWPDGLLASDNTLHFVHPLTVNYSGVVVCVKSNSLGQRSDQKVYISDIPPT	360
Nectin-3γ	KSVWSRLDGGQWPDGLLASDNTLHFVHPLTVNYSGVVVCVKSNSLGQRSDQKVYISDIPPT	360
Nectin-3α	TTTLOPTVQWHSSPADVQDIA TEHKKLPFPPLSTLATLKDDTIGTIIASVVGGALFLVLVS	420
Nectin-3β	TTTSSIAVAGAVIGAVLALFIIITVFVTVLTPRKKRPSYLDKVIDLPTTHKPPPVYEEERI	420
Nectin-3γ	TTTSSIAVAGAVIGAVLALFIIITVFVTVLTPRKKRPSYLDKVIDLPTTHKPPPVYEEERI	420
Nectin-3α	ILAGVFCYRRRRRTFRQDYFAKNYIPPSOMQKESQIDVLHQDELDSYPPDSVKKENKPNVNN	480
Nectin-3β	PSLPQKbL'LGQTEHLPLQTOFKEKGAGGLQPSNGPI SRRFDYEDESTMQEDQGTQRMCPLY	480
Nectin-3γ	PSLPQKDL'LGQVRALED	438
Nectin-3α	LIRKDYLEEPEKQTQWNNVENLTRFERPMDYYEOLKMGMKFVSDERYNESEDGLVSHVDGS	540
Nectin-3β	SQMCHQDRSPRQHHPNRPRLYINPREHYV	510
Nectin-3γ	VISRRREWYV	549

2/10

2

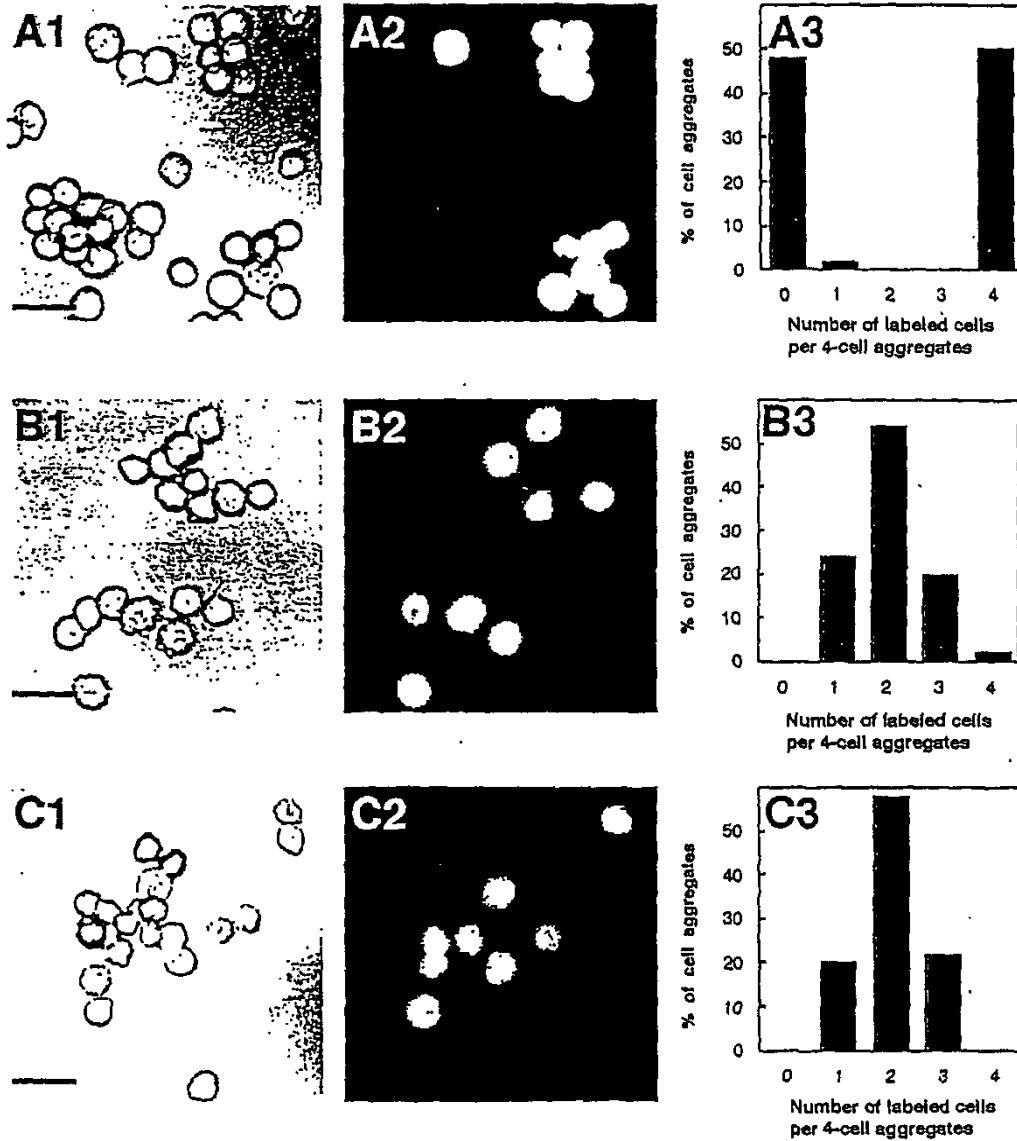
A**B**

3/10
☒ 3



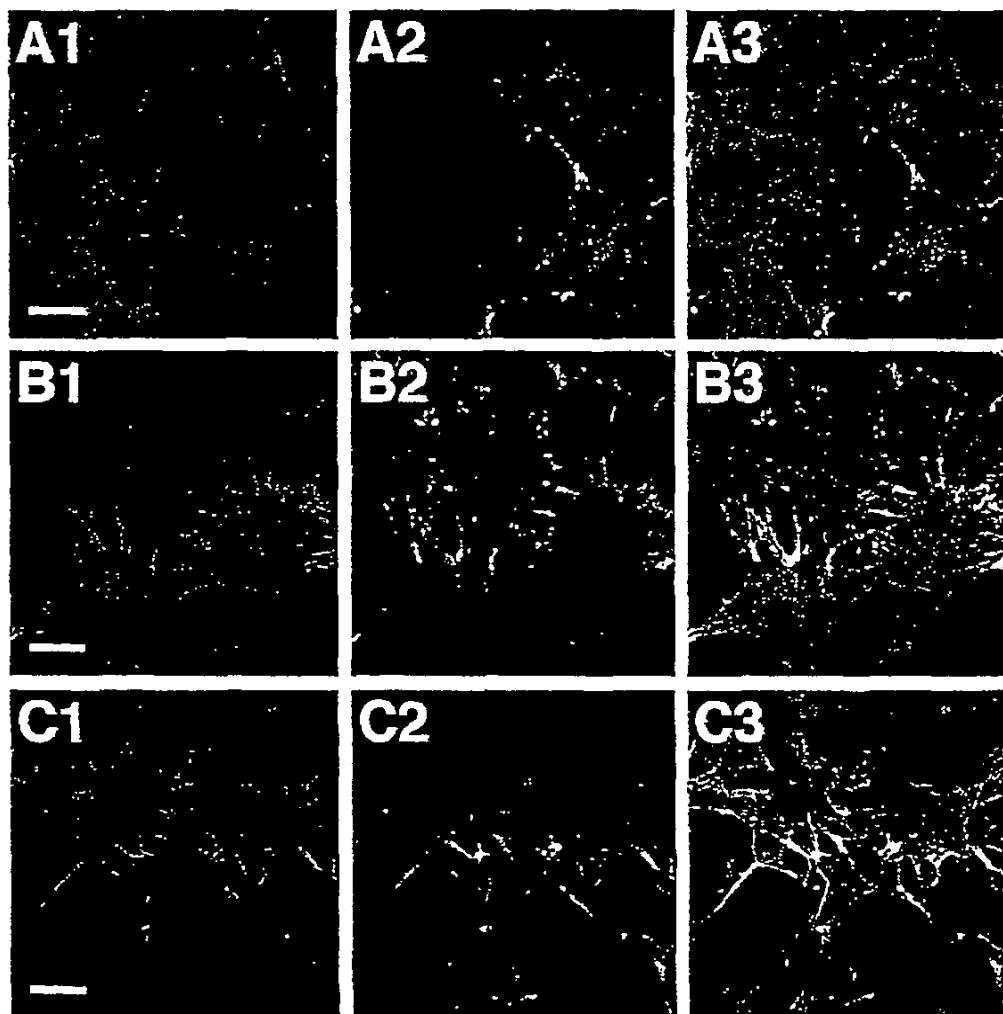
4/10

図 4

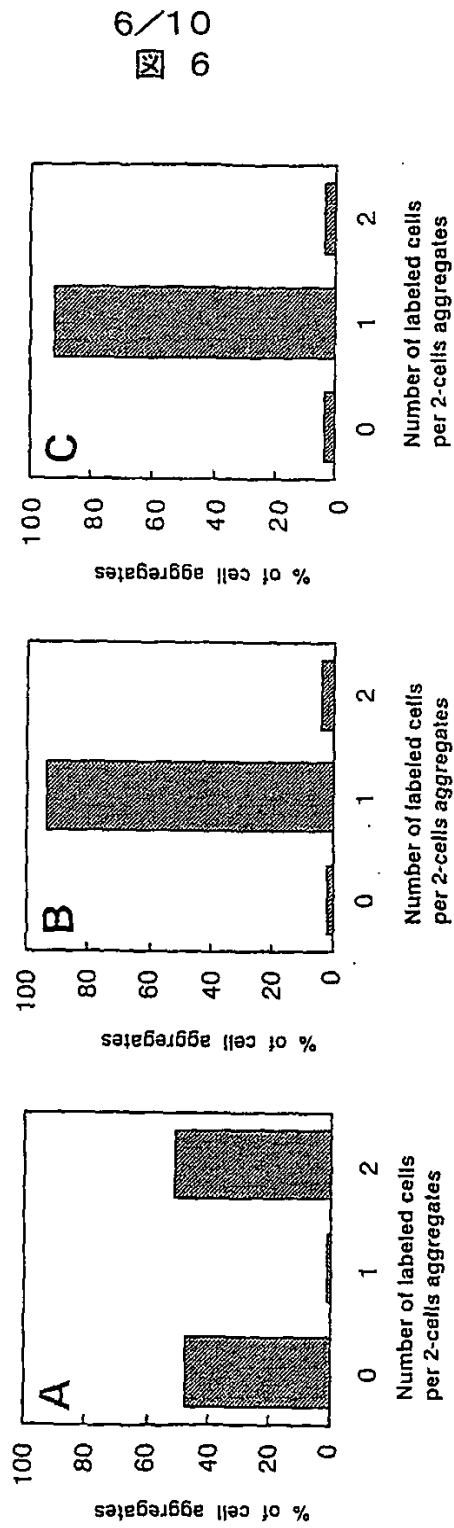


5/10

図 5



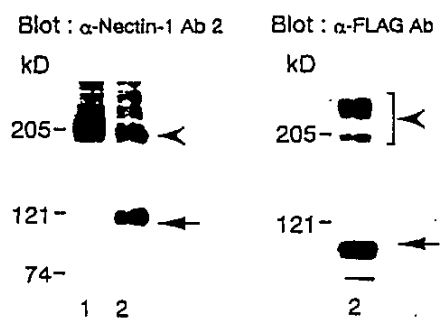
1



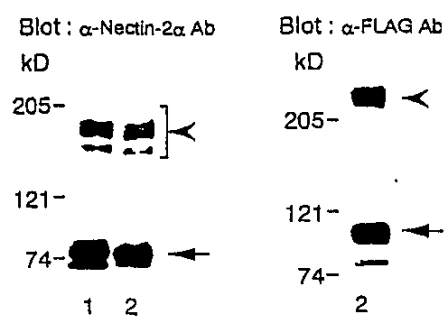
7/10

図 7

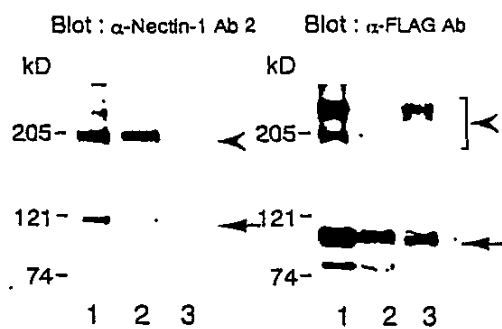
A1



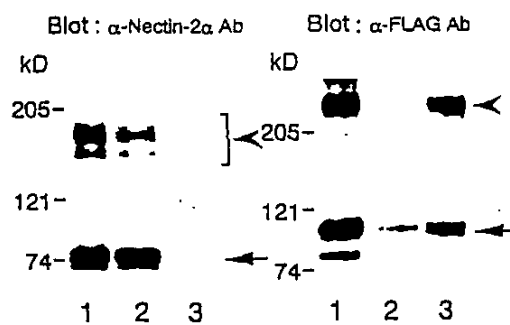
A2



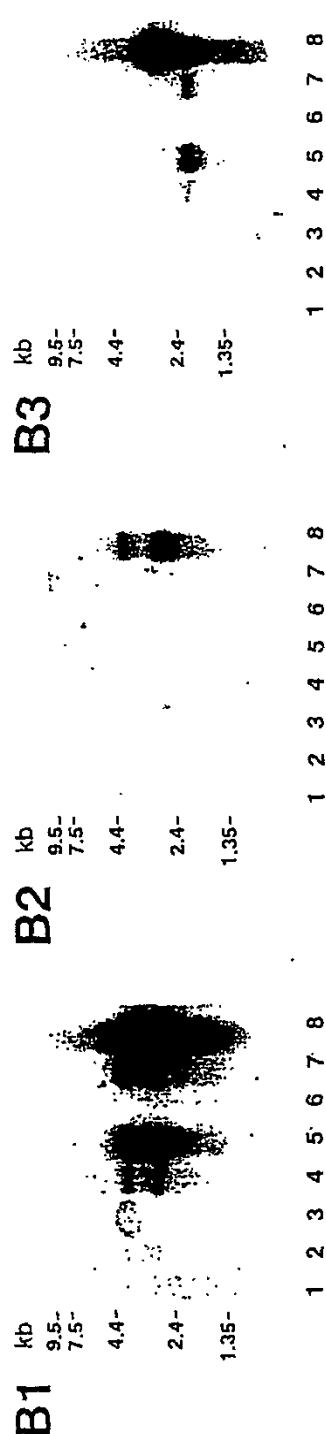
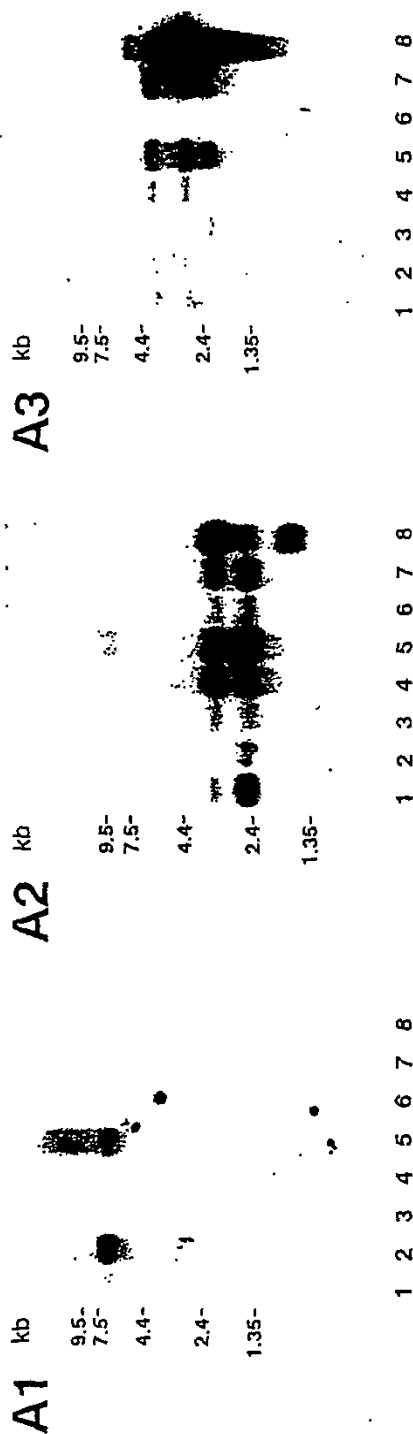
B1



B2

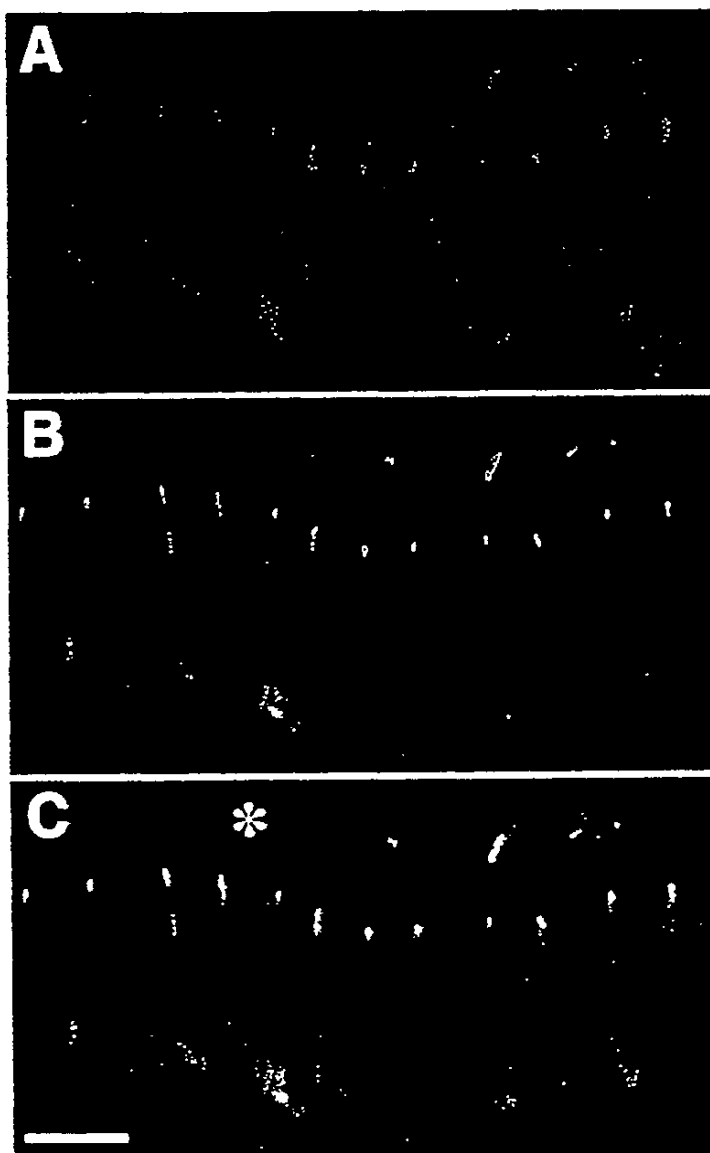


8/10
☒ 8

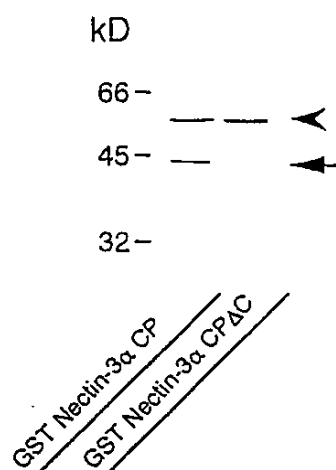


9/10

☒ 9



10/10
☒ 10



配列表

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

5 <120> Protein Nectine-3

<130> 00-F-039PCT/YS

<140>

10 <141>

<150> JP 2000-65595

<151> 2000-03-09

15 <160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

20 <211> 1650

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

25 <221> CDS

<222> (1).. (1650)

<300>

<301> Satoh-Horikawa K. et al.

<302> Nectin-3, a new member of immunoglobulin-like cell adhesion molecules that shows homophilic and heterophilic cell-cell adhesion activities.

<303> J. Biol. Chem.

5 <304> 275

<305> 14

<306> 10291-10299

<307> 2000-04-07

10 <400> 1

atg gcg cgg acc ccg ggc ccg gcc cgg ttg tgt cct gga ggc ggc aaa 48
 Met Ala Arg Thr Pro Gly Pro Ala Pro Leu Cys Pro Gly Gly Gly Lys
 1 5 10 15

15 gca caa ott tcc tcg gcg ttt cct ccc gcg gcc gga ctg ctg ctg ccg 96
 Ala Gln Leu Ser Ser Ala Phe Pro Pro Ala Ala Gly Leu Leu Leu Pro
 20 25 30

gcc ccg acg ccg ccg ccg ctg ctg ctg ctg ott att ccc ctg ett ctc 144
 20 Ala Pro Thr Pro Pro Pro Leu Leu Leu Leu Leu Ile Pro Leu Leu Leu
 35 40 45

ttc tcc cgg etc tgt ggt gcc tta gct gga tca att att gtg gag cca 192
 Phe Ser Arg Leu Cys Gly Ala Leu Ala Gly Ser Ile Ile Val Glu Pro
 25 50 55 60

cat gtc aca gca gtg tgg gga aag aat gtt tca ttg aag tgt tta att 240
 His Val Thr Ala Val Trp Gly Lys Asn Val Ser Leu Lys Cys Leu Ile

	65	70	75	80	
	gaa gtg aat gaa act ata acc cag atc tca tgg gag aag ata cat ggc				288
	Glu Val Asn Glu Thr Ile Thr Gln Ile Ser Trp Glu Lys Ile His Gly				
5		85	90	95	
	aaa agt aca cag act gtt gca gtt cat cat cct cag tat gga ttc tct				336
	Lys Ser Thr Gln Thr Val Ala Val His His Pro Gln Tyr Gly Phe Ser				
	100	105	110		
10	gtt caa gga gat tat cag gga aga gtc ttg ttt aaa aac tat tca ctt				384
	Val Gln Gly Asp Tyr Gln Gly Arg Val Leu Phe Lys Asn Tyr Ser Leu				
	115	120	125		
15	aat gat gca aca att act ctg cat aac ata ggc ttc tca gat tct gga				432
	Asn Asp Ala Thr Ile Thr Leu His Asn Ile Gly Phe Ser Asp Ser Gly				
	130	135	140		
	aaa tat ata tgc aaa gcc gtt aca ttc cca ctt gga aat gct cag tcc				480
20	Lys Tyr Ile Cys Lys Ala Val Thr Phe Pro Leu Gly Asn Ala Gln Ser				
	145	150	155	160	
	tct aca aca gtg act gtg tta gtt gaa ccc aca gtg agc ctg ata aaa				528
	Ser Thr Thr Val Thr Val Leu Val Glu Pro Thr Val Ser Leu Ile Lys				
25	165	170	175		
	ggg ccg gat tct tta att gat gga ggg aat gag aca gta gca gcc gtt				576
	Gly Pro Asp Ser Leu Ile Asp Gly Gly Asn Glu Thr Val Ala Ala Val				

	180	185	190	
	tgt gta gca gcc act gga aag cca gtc gca cag att gac tgg gaa ggt 624			
	Cys Val Ala Ala Thr Gly Lys Pro Val Ala Gln Ile Asp Trp Glu Gly			
5	195	200	205	
	gat ctt ggt gaa atg gaa tct agt aca act tot ttt cct aat gaa aca 672			
	Asp Leu Gly Glu Met Glu Ser Ser Thr Thr Ser Phe Pro Asn Glu Thr			
	210	215	220	
10				
	gca acg att gtc agc caa tac aag ctg ttt ccc aca aga ttt gct cga 720			
	Ala Thr Ile Val Ser Gln Tyr Lys Leu Phe Pro Thr Arg Phe Ala Arg			
	225	230	235	240
15	gga agg cga att act tgt gtt gta aaa cat cca gcc tta gaa aag gac 768			
	Gly Arg Arg Ile Thr Cys Val Val Lys His Pro Ala Leu Glu Lys Asp			
	245	250	255	
	att cgc tac tct ttc ata cta gac ata cag tat gct cct gaa gtt tca 816			
20	Ile Arg Tyr Ser Phe Ile Leu Asp Ile Gln Tyr Ala Pro Glu Val Ser			
	260	265	270	
	gta aca gga tat gat gga aat tgg ttc gtg gga aga aaa ggt gtt aac 864			
	Val Thr Gly Tyr Asp Gly Asn Trp Phe Val Gly Arg Lys Gly Val Asn			
25	275	280	285	
	ctc aag tgt aat got gat gca aac cct cca ccc ttc aag tcc gtg tgg 912			
	Leu Lys Cys Asn Ala Asp Ala Asn Pro Pro Pro Phe Lys Ser Val Trp			

	290	295	300	
	agc agg ttg gat gga caa tgg cct gat ggt tta ttg gcg tca gat aat			960
	Ser Arg Leu Asp Gly Gln Trp Pro Asp Gly Leu Leu Ala Ser Asp Asn			
5	305	310	315	320
	act ctt cat ttt gtc cat cca ttg act gtc aat tat tct ggc gtt tat			1008
	Thr Leu His Phe Val His Pro Leu Thr Val Asn Tyr Ser Gly Val Tyr			
		325	330	335
10				
	gtc tgt aaa gta tca aat tcc ctt ggt caa aga agt gat caa aag gtt			1056
	Val Cys Lys Val Ser Asn Ser Leu Gly Gln Arg Ser Asp Gln Lys Val			
		340	345	350
15	atc tac att tca gat cct cct acc acc acc acc ctt cag ccg aca gtt			1104
	Ile Tyr Ile Ser Asp Pro Pro Thr Thr Thr Thr Leu Gln Pro Thr Val			
		355	360	365
	cag tgg cat tcc tca cct gct gac gtc cag gat ata gca aca gag cat			1152
20	Gln Trp His Ser Ser Pro Ala Asp Val Gln Asp Ile Ala Thr Glu His			
		370	375	380
	aaa aaa ttg ccc ttt cct ttg tca act ttg gca aca ctt aag gat gac			1200
	Lys Lys Leu Pro Phe Pro Leu Ser Thr Leu Ala Thr Leu Lys Asp Asp			
25	385	390	395	400
	aca att ggc acc atc att gct agt gta gtg ggt ggg gct ctc ttc tta			1248
	Thr Ile Gly Thr Ile Ile Ala Ser Val Val Gly Gly Ala Leu Phe Leu			

6/31

	405	410	415	
	gtg ctt gtg agc att tta gct ggg gta ttc tgc tat agg aga cga cgg			1296
	Val Leu Val Ser Ile Leu Ala Gly Val Phe Cys Tyr Arg Arg Arg Arg			
5	420	425	430	
	acg ttt cgt gga gac tac ttt gcc aaa aac tac att cca cca tca gac			1344
	Thr Phe Arg Gly Asp Tyr Phe Ala Lys Asn Tyr Ile Pro Pro Ser Asp			
	435	440	445	
10				
	atg cag aaa gaa tca cag att gat gtt ctt cac cag gat gag ctg gat			1392
	Met Gln Lys Glu Ser Gln Ile Asp Val Leu His Gln Asp Glu Leu Asp			
	450	455	460	
15	tot tac cca gac agt gta aaa aag gaa aac aaa aat cca gta aac aac			1440
	Ser Tyr Pro Asp Ser Val Lys Lys Glu Asn Lys Asn Pro Val Asn Asn			
	465	470	475	480
	ctg atc cgc aaa gac tac tta gag gag cct gag aaa act cag tgg aat			1488
20	Leu Ile Arg Lys Asp Tyr Leu Glu Glu Pro Glu Lys Thr Gln Trp Asn			
	485	490	495	
	aat gta gag aac ctc act agg ttt gaa aga ccg atg gat tac tat gaa			1536
	Asn Val Glu Asn Leu Thr Arg Phe Glu Arg Pro Met Asp Tyr Tyr Glu			
25	500	505	510	
	gat cta aaa atg gga atg aag ttt gtc agt gat gaa cgc tac aat gaa			1584
	Asp Leu Lys Met Gly Met Lys Phe Val Ser Asp Glu Arg Tyr Asn Glu			

515 520 525

agt gaa gat ggt ttg gtt tct cat gta gat ggc tcc gta att tcc agg 1632
Ser Glu Asp Gly Leu Val Ser His Val Asp Gly Ser Val Ile Ser Arg

5 530 535 540

agg gag tgg tat gtc taa 1650
Arg Glu Trp Tyr Val

545 550

10

<210> 2
<211> 549
<212> PRT
15 <213> Mouse

<400> 2

Met Ala Arg Thr Pro Gly Pro Ala Pro Leu Cys Pro Gly Gly Gly Lys
1 5 10 15
20 Ala Gln Leu Ser Ser Ala Phe Pro Pro Ala Ala Gly Leu Leu Leu Pro
20 25 30
Ala Pro Thr Pro Pro Pro Leu Leu Leu Leu Ile Pro Leu Leu Leu
35 40 45
Phe Ser Arg Leu Cys Gly Ala Leu Ala Gly Ser Ile Ile Val Glu Pro
25 50 55 60
His Val Thr Ala Val Trp Gly Lys Asn Val Ser Leu Lys Cys Leu Ile
65 70 75 80
Glu Val Asn Glu Thr Ile Thr Gln Ile Ser Trp Glu Lys Ile His Gly

	85	90	95
	Lys Ser Thr Gln Thr Val Ala Val His His Pro Gln Tyr Gly Phe Ser		
	100	105	110
	Val Gln Gly Asp Tyr Gln Gly Arg Val Leu Phe Lys Asn Tyr Ser Leu		
5	115	120	125
	Asn Asp Ala Thr Ile Thr Leu His Asn Ile Gly Phe Ser Asp Ser Gly		
	130	135	140
	Lys Tyr Ile Cys Lys Ala Val Thr Phe Pro Leu Gly Asn Ala Gln Ser		
	145	150	155
10	160	165	170
	Ser Thr Thr Val Thr Val Leu Val Glu Pro Thr Val Ser Leu Ile Lys		
	175	180	185
	Gly Pro Asp Ser Leu Ile Asp Gly Gly Asn Glu Thr Val Ala Ala Val		
	190	195	200
	Cys Val Ala Ala Thr Gly Lys Pro Val Ala Gln Ile Asp Trp Glu Gly		
15	205	210	215
	Asp Leu Gly Glu Met Glu Ser Ser Thr Thr Ser Phe Pro Asn Glu Thr		
	220	225	230
	Ala Thr Ile Val Ser Gln Tyr Lys Leu Phe Pro Thr Arg Phe Ala Arg		
	235	240	245
20	250	255	260
	Gly Arg Arg Ile Thr Cys Val Val Lys His Pro Ala Leu Glu Lys Asp		
	265	270	275
	Ile Arg Tyr Ser Phe Ile Leu Asp Ile Gln Tyr Ala Pro Glu Val Ser		
	280	285	290
	Val Thr Gly Tyr Asp Gly Asn Trp Phe Val Gly Arg Lys Gly Val Asn		
25	295	300	305
	Leu Lys Cys Asn Ala Asp Ala Asn Pro Pro Pro Phe Lys Ser Val Trp		
	310	315	320
	Ser Arg Leu Asp Gly Gln Trp Pro Asp Gly Leu Leu Ala Ser Asp Asn		

9/31

305 310 315 320
 Thr Leu His Phe Val His Pro Leu Thr Val Asn Tyr Ser Gly Val Tyr
 325 330 335
 Val Cys Lys Val Ser Asn Ser Leu Gly Gln Arg Ser Asp Gln Lys Val
 5 340 345 350
 Ile Tyr Ile Ser Asp Pro Pro Thr Thr Thr Thr Leu Gln Pro Thr Val
 355 360 365
 Gln Trp His Ser Ser Pro Ala Asp Val Gln Asp Ile Ala Thr Glu His
 370 375 380
 10 Lys Lys Leu Pro Phe Pro Leu Ser Thr Leu Ala Thr Leu Lys Asp Asp
 385 390 395 400
 Thr Ile Gly Thr Ile Ile Ala Ser Val Val Gly Gly Ala Leu Phe Leu
 405 410 415
 Val Leu Val Ser Ile Leu Ala Gly Val Phe Cys Tyr Arg Arg Arg Arg
 15 420 425 430
 Thr Phe Arg Gly Asp Tyr Phe Ala Lys Asn Tyr Ile Pro Pro Ser Asp
 435 440 445
 Met Gln Lys Glu Ser Gln Ile Asp Val Leu His Gln Asp Glu Leu Asp
 450 455 460
 20 Ser Tyr Pro Asp Ser Val Lys Lys Glu Asn Lys Asn Pro Val Asn Asn
 465 470 475 480
 Leu Ile Arg Lys Asp Tyr Leu Glu Glu Pro Glu Lys Thr Gln Trp Asn
 485 490 495
 Asn Val Glu Asn Leu Thr Arg Phe Glu Arg Pro Met Asp Tyr Tyr Glu
 25 500 505 510
 Asp Leu Lys Met Gly Met Lys Phe Val Ser Asp Glu Arg Tyr Asn Glu
 515 520 525
 Ser Glu Asp Gly Leu Val Ser His Val Asp Gly Ser Val Ile Ser Arg

530

535

540

Arg Glu Trp Tyr Val

545

5

<210> 3

<211> 1533

<212> DNA

10 <213> Mouse

<220>

<221> GDS

<222> (1).. (1533)

15

<300>

<301> Satoh-Horikawa K. et al.

<302> Nectin-3, a new member of immunoglobulin-like cell adhesion molecules that shows
homophilic and heterophilic cell-cell adhesion activities.

20 <303> J. Biol. Chem.

<304> 275

<305> 14

<306> 10291-10299

<307> 2000-04-07

25 <308> GenBank accession No. AF195834

<309> 2000-04-13

<400> 3


```

atg gcg cgg acc ccg ggc ccg gcc ccg ttg tgt cct gga ggc ggc aaa 48
Met Ala Arg Thr Pro Gly Pro Ala Pro Leu Cys Pro Gly Gly Gly Lys
  1           5           10           15

5  gca caa ctt tcc tog gcg ttt cct ccc gog gcc gga ctg ctg ctg ccg 96
Ala Gln Leu Ser Ser Ala Phe Pro Pro Ala Ala Gly Leu Leu Leu Pro
      20           25           30

gcc ccg acg ccg ccg ccg ctg ctg ctg ctg ctt att ccc ctg ctt etc 144
10 Ala Pro Thr Pro Pro Pro Leu Leu Leu Leu Leu Ile Pro Leu Leu Leu
      35           40           45

ttc tcc cgg ctc tgt ggt gcc tta gct gga tca att att gtg gag cca 192
Phe Ser Arg Leu Cys Gly Ala Leu Ala Gly Ser Ile Ile Val Glu Pro
15      50           55           60

cat gtc aca gca gtg tgg gga aag aat gtt tca ttg aag tgt tta att 240
His Val Thr Ala Val Trp Gly Lys Asn Val Ser Leu Lys Cys Leu Ile
      65           70           75           80
20

gaa gtg aat gaa act ata acc oag atc tca tgg gag aag ata cat ggc 288
Glu Val Asn Glu Thr Ile Thr Gln Ile Ser Trp Glu Lys Ile His Gly
      85           90           95

25  aaa agt aca cag act gtt gca gtt cat cat cct cag tat gga ttc tct 336
Lys Ser Thr Gln Thr Val Ala Val His His Pro Gln Tyr Gly Phe Ser
      100           105           110

```

gtt caa gga gat tat cag gga aga gtc ttg ttt aaa aac tat tca ctt 384
 Val Gln Gly Asp Tyr Gln Gly Arg Val Leu Phe Lys Asn Tyr Ser Leu
 115 120 125

5 aat gat gca aca att act ctg cat aac ata ggc ttc tca gat tct gga 432
 Asn Asp Ala Thr Ile Thr Leu His Asn Ile Gly Phe Ser Asp Ser Gly
 130 135 140

aaa tat ata tgc aaa gcc gtt aca ttc cca ctt gga aat gct cag tcc 480
 10 Lys Tyr Ile Cys Lys Ala Val Thr Phe Pro Leu Gly Asn Ala Gln Ser
 145 150 155 160

tct aca aca gtg act gtg tta gtt gaa ccc aca gtg agc ctg ata aaa 528
 Ser Thr Thr Val Thr Val Leu Val Glu Pro Thr Val Ser Leu Ile Lys
 15 165 170 175

ggg ccg gat tct tta att gat gga ggg aat gag aca gta gca gcc gtt 576
 Gly Pro Asp Ser Leu Ile Asp Gly Gly Asn Glu Thr Val Ala Ala Val
 180 185 190

20 tgt gta gca gcc act gga aag cca gtc gca cag att gac tgg gaa ggt 624
 Cys Val Ala Ala Thr Gly Lys Pro Val Ala Gln Ile Asp Trp Glu Gly
 195 200 205

25 gat ctt ggt gaa atg gaa tct agt aca act tct ttt cct aat gaa aca 672
 Asp Leu Gly Glu Met Glu Ser Ser Thr Thr Ser Phe Pro Asn Glu Thr
 210 215 220

gca acg att gtc ago caa tac aag ctg ttt ccc aca aga ttt gct cga 720
 Ala Thr Ile Val Ser Gln Tyr Lys Leu Phe Pro Thr Arg Phe Ala Arg
 225 230 235 240

5 gga agg cga att act tgt gtt gta aaa cat cca gcc tta gaa aag gac 768
 Gly Arg Arg Ile Thr Cys Val Val Lys His Pro Ala Leu Glu Lys Asp
 245 250 255

att cgc tac tct ttc ata cta gac ata cag tat gct cct gaa gtt tca 816
 10 Ile Arg Tyr Ser Phe Ile Leu Asp Ile Gln Tyr Ala Pro Glu Val Ser
 260 265 270

gta aca gga tat gat gga aat tgg ttc gtg gga aga aaa ggt gtt aac 864
 Val Thr Gly Tyr Asp Gly Asn Trp Phe Val Gly Arg Lys Gly Val Asn
 15 275 280 285

ctc aag tgt aat gct gat gca aac cct cca ccc ttc aag tcc gtg tgg 912
 Leu Lys Cys Asn Ala Asp Ala Asn Pro Pro Pro Phe Lys Ser Val Trp
 290 295 300

20 ago agg ttg gat gga caa tgg cct gat ggt tta ttg gcg tca gat aat 960
 Ser Arg Leu Asp Gly Gln Trp Pro Asp Gly Leu Leu Ala Ser Asp Asn
 305 310 315 320

25 act ctt cat ttt gtc cat cca ttg act gtc aat tat tct ggc gtt tat 1008
 Thr Leu His Phe Val His Pro Leu Thr Val Asn Tyr Ser Gly Val Tyr
 325 330 335

gtc tgt aaa gta tca aat tcc ctt ggt caa aga agt gat caa aag gtt 1056
 Val Cys Lys Val Ser Asn Ser Leu Gly Gln Arg Ser Asp Gln Lys Val
 340 345 350

5 atc tac att tca gac atc ccg ctt acg cag acc tca tcc ata gca gtg 1104
 Ile Tyr Ile Ser Asp Ile Pro Leu Thr Gln Thr Ser Ser Ile Ala Val
 355 360 365

gct gga gcc gtg att gga gct gtc ctg gcc ctc ttc atc atc acc gtc 1152
 10 Ala Gly Ala Val Ile Gly Ala Val Leu Ala Leu Phe Ile Ile Thr Val
 370 375 380

ttt gtg act gtg ttg ctg acg cct cgg aaa aag aga ccg tcc tat ctt 1200
 Phe Val Thr Val Leu Leu Thr Pro Arg Lys Lys Arg Pro Ser Tyr Leu
 15 385 390 395 400

gac aaa gta atc gac ctt cca cct aca cat aag cca ccc cct gta tat 1248
 Asp Lys Val Ile Asp Leu Pro Pro Thr His Lys Pro Pro Pro Val Tyr
 405 410 415

20 gaa gaa cga att cct tct ctc cct cag aaa gac ctt ctt ggc cag act 1296
 Glu Glu Arg Ile Pro Ser Leu Pro Gln Lys Asp Leu Leu Gly Gln Thr
 420 425 430

25 gaa cac ttg cct ttg cag act cag ttc aag gag aaa gga gct ggt ggt 1344
 Glu His Leu Pro Leu Gln Thr Gln Phe Lys Glu Lys Gly Ala Gly Gly
 435 440 445

15/31

ctt cag ccc tct aat gga cca att agc agg aga ttt gac tat gag gat 1392
 Leu Gln Pro Ser Asn Gly Pro Ile Ser Arg Arg Phe Asp Tyr Glu Asp
 450 455 460

5 gag agc aca atg caa gaa gat gga act cag cgc atg tgc ccc ctt tat 1440
 Glu Ser Thr Met Gln Glu Asp Gly Thr Gln Arg Met Cys Pro Leu Tyr
 465 470 475 480

agc cag atg tgc cac caa gac cga agc cct cgc caa cat cac oca cgc 1488
 10 Ser Gln Met Cys His Gln Asp Arg Ser Pro Arg Gln His His Pro Arg
 485 490 495

aac ccc gag aga ctc tac atc aac cca cga gaa cat tat gtg tga 1533
 Asn Pro Glu Arg Leu Tyr Ile Asn Pro Arg Glu His Tyr Val
 15 500 505 510

<210> 4

<211> 510

20 <212> PRT

<213> Mouse

<400> 4

Met Ala Arg Thr Pro Gly Pro Ala Pro Leu Cys Pro Gly Gly Gly Lys
 25 1 5 10 15
 Ala Gln Leu Ser Ser Ala Phe Pro Pro Ala Ala Gly Leu Leu Leu Pro
 20 25 30
 Ala Pro Thr Pro Pro Pro Leu Leu Leu Leu Ile Pro Leu Leu Leu

	35	40	45
	Phe Ser Arg Leu Cys Gly Ala Leu Ala Gly Ser Ile Ile Val Glu Pro		
	50	55	60
	His Val Thr Ala Val Trp Gly Lys Asn Val Ser Leu Lys Cys Leu Ile		
5	65	70	75
	Glu Val Asn Glu Thr Ile Thr Gln Ile Ser Trp Glu Lys Ile His Gly		
	85	90	95
	Lys Ser Thr Gln Thr Val Ala Val His His Pro Gln Tyr Gly Phe Ser		
	100	105	110
10	Val Gln Gly Asp Tyr Gln Gly Arg Val Leu Phe Lys Asn Tyr Ser Leu		
	115	120	125
	Asn Asp Ala Thr Ile Thr Leu His Asn Ile Gly Phe Ser Asp Ser Gly		
	130	135	140
	Lys Tyr Ile Cys Lys Ala Val Thr Phe Pro Leu Gly Asn Ala Gln Ser		
15	145	150	155
	Ser Thr Thr Val Thr Val Leu Val Glu Pro Thr Val Ser Leu Ile Lys		
	165	170	175
	Gly Pro Asp Ser Leu Ile Asp Gly Gly Asn Glu Thr Val Ala Ala Val		
	180	185	190
20	Cys Val Ala Ala Thr Gly Lys Pro Val Ala Gln Ile Asp Trp Glu Gly		
	195	200	205
	Asp Leu Gly Glu Met Glu Ser Ser Thr Thr Ser Phe Pro Asn Glu Thr		
	210	215	220
	Ala Thr Ile Val Ser Gln Tyr Lys Leu Phe Pro Thr Arg Phe Ala Arg		
25	225	230	235
	Gly Arg Arg Ile Thr Cys Val Val Lys His Pro Ala Leu Glu Lys Asp		
	245	250	255
	Ile Arg Tyr Ser Phe Ile Leu Asp Ile Gln Tyr Ala Pro Glu Val Ser		

260 265 270
 Val Thr Gly Tyr Asp Gly Asn Trp Phe Val Gly Arg Lys Gly Val Asn
 275 280 285
 Leu Lys Cys Asn Ala Asp Ala Asn Pro Pro Pro Phe Lys Ser Val Trp
 5 290 295 300
 Ser Arg Leu Asp Gly Gln Trp Pro Asp Gly Leu Leu Ala Ser Asp Asn
 305 310 315 320
 Thr Leu His Phe Val His Pro Leu Thr Val Asn Tyr Ser Gly Val Tyr
 325 330 335
 10 Val Cys Lys Val Ser Asn Ser Leu Gly Gln Arg Ser Asp Gln Lys Val
 340 345 350
 Ile Tyr Ile Ser Asp Ile Pro Leu Thr Gln Thr Ser Ser Ile Ala Val
 355 360 365
 Ala Gly Ala Val Ile Gly Ala Val Leu Ala Leu Phe Ile Ile Thr Val
 15 370 375 380
 Phe Val Thr Val Leu Leu Thr Pro Arg Lys Lys Arg Pro Ser Tyr Leu
 385 390 395 400
 Asp Lys Val Ile Asp Leu Pro Pro Thr His Lys Pro Pro Pro Val Tyr
 405 410 415
 20 Glu Glu Arg Ile Pro Ser Leu Pro Gln Lys Asp Leu Leu Gly Gln Thr
 420 425 430
 Glu His Leu Pro Leu Gln Thr Gln Phe Lys Glu Lys Gly Ala Gly Gly
 435 440 445
 Leu Gln Pro Ser Asn Gly Pro Ile Ser Arg Arg Phe Asp Tyr Glu Asp
 25 450 455 460
 Glu Ser Thr Met Gln Glu Asp Gly Thr Gln Arg Met Cys Pro Leu Tyr
 465 470 475 480
 Ser Gln Met Cys His Gln Asp Arg Ser Pro Arg Gln His His Pro Arg

485 490 495
Asn Pro Glu Arg Leu Tyr Ile Asn Pro Arg Glu His Tyr Val
500 505 510

5

<210> 5

<211> 1317

<212> DNA

10 <213> Mouse

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1317)

15

<300>

<301> Satoh-Horikawa K. et al.

<302> Nectin-3, a new member of immunoglobulin-like cell adhesion molecules that shows
homophilic and heterophilic cell-cell adhesion activities.

20 <303> J. Biol. Chem.

<304> 275

<305> 14

<306> 10291-10299

<307> 2000-04-07

25 <308> GenBank accession No. AF195835

<309> 2000-04-13

<400> 5


```

atg gcg cgg acc ccg ggc ccg gcc ccg ttg tgt cct gga ggc ggc aaa 48
Met Ala Arg Thr Pro Gly Pro Ala Pro Leu Cys Pro Gly Gly Gly Lys
  1           5           10           15

5  goa caa ctt tcc tcg gcg ttt cct ccc gcg gcc gga ctg ctg ctg ccg 96
Ala Gln Leu Ser Ser Ala Phe Pro Pro Ala Ala Gly Leu Leu Leu Pro
      20           25           30

gcc ccg acg ccg ccg ccg ctg ctg ctg ctg ctt att ccc ctg ctt ctc 144
10 Ala Pro Thr Pro Pro Pro Leu Leu Leu Leu Leu Ile Pro Leu Leu Leu
      35           40           45

ttc tcc cgg ctc tgt ggt gcc tta gct gga tca att att gtg gag cca 192
Phe Ser Arg Leu Cys Gly Ala Leu Ala Gly Ser Ile Ile Val Glu Pro
15      50           55           60

cat gtc aca gca gtg tgg gga aag aat gtt tca ttg aag tgt tta att 240
His Val Thr Ala Val Trp Gly Lys Asn Val Ser Leu Lys Cys Leu Ile
      65           70           75           80
20

gaa gtg aat gaa act ata acc cag atc tca tgg gag aag ata cat ggc 288
Glu Val Asn Glu Thr Ile Thr Gln Ile Ser Trp Glu Lys Ile His Gly
      85           90           95

25  aaa agt aca cag act gtt gca gtt cat cat cct cag tat gga ttc tct 336
Lys Ser Thr Gln Thr Val Ala Val His His Pro Gln Tyr Gly Phe Ser
      100           105           110

```

gtt caa gga gat tat cag gga aga gtc ttg ttt aaa aac tat tca ctt 384
Val Gln Gly Asp Tyr Gln Gly Arg Val Leu Phe Lys Asn Tyr Ser Leu
115 120 125

5 aat gat gca aca att act ctg cat aac ata ggc ttc tca gat tct gga 432
Asn Asp Ala Thr Ile Thr Leu His Asn Ile Gly Phe Ser Asp Ser Gly
130 135 140

aaa tat ata tgc aaa gcc gtt aca ttc cca ott gga aat gct cag tcc 480
10 Lys Tyr Ile Cys Lys Ala Val Thr Phe Pro Leu Gly Asn Ala Gln Ser
145 150 155 160

tct aca aca gtg act gtg tta gtt gaa ccc aca gtg agc ctg ata aaa 528
Ser Thr Thr Val Thr Val Leu Val Glu Pro Thr Val Ser Leu Ile Lys
15 165 170 175

ggg ccg gat tct tta att gat gga ggg aat gag aca gta gca gcc gtt 576
Gly Pro Asp Ser Leu Ile Asp Gly Gly Asn Glu Thr Val Ala Ala Val
180 185 190

20 tgt gta gca gcc act gga aag cca gtc gca cag att gac tgg gaa ggt 624
Cys Val Ala Ala Thr Gly Lys Pro Val Ala Gln Ile Asp Trp Glu Gly
195 200 205

25 gat ctt ggt gaa atg gaa tct agt aca act tct ttt cct aat gaa aca 672
Asp Leu Gly Glu Met Glu Ser Ser Thr Thr Ser Phe Pro Asn Glu Thr
210 215 220

gca acg att gtc agc caa tac aag ctg ttt ccc aca aga ttt gct cga 720
 Ala Thr Ile Val Ser Gln Tyr Lys Leu Phe Pro Thr Arg Phe Ala Arg
 225 230 235 240

5 gga agg cga att act tgt gtt gta aaa cat cca gcc tta gaa aag gac 768
 Gly Arg Arg Ile Thr Cys Val Val Lys His Pro Ala Leu Glu Lys Asp
 245 250 255

att cgc tac tct ttc ata cta gac ata cag tat gct cct gaa gtt tca 816
 10 Ile Arg Tyr Ser Phe Ile Leu Asp Ile Gln Tyr Ala Pro Glu Val Ser
 260 265 270

gta aca gga tat gat gga aat tgg ttc gtg gga aga aaa ggt gtt aac 864
 Val Thr Gly Tyr Asp Gly Asn Trp Phe Val Gly Arg Lys Gly Val Asn
 15 275 280 285

ctc aag tgt aat gct gat gca aac cct cca ccc ttc aag tcc gtg tgg 912
 Leu Lys Cys Asn Ala Asp Ala Asn Pro Pro Pro Phe Lys Ser Val Trp
 290 295 300

20 agc agg ttg gat gga caa tgg cct gat ggt tta ttg gcg tca gat aat 960
 Ser Arg Leu Asp Gly Gln Trp Pro Asp Gly Leu Leu Ala Ser Asp Asn
 305 310 315 320

25 act ctt cat ttt gtc cat cca ttg act gtc aat tat tct ggc gtt tat 1008
 Thr Leu His Phe Val His Pro Leu Thr Val Asn Tyr Ser Gly Val Tyr
 325 330 335

gtc tgt aaa gta tca aat tcc ctt ggt caa aga agt gat caa aag gtt 1056
 Val Cys Lys Val Ser Asn Ser Leu Gly Gln Arg Ser Asp Gln Lys Val
 340 345 350

5 atc tac att tca gac atc ccg ctt acg cag acc tca tcc ata gca gtg 1104
 Ile Tyr Ile Ser Asp Ile Pro Leu Thr Gln Thr Ser Ser Ile Ala Val
 355 360 365

gct gga gcc gtg att gga gct gtc ctg gcc ctc ttc atc atc acc gtc 1152
 10 Ala Gly Ala Val Ile Gly Ala Val Leu Ala Leu Phe Ile Ile Thr Val
 370 375 380

ttt gtg act gtg ttg ctg acg cct cgg aaa aag aga ccg tcc tat ctt 1200
 Phe Val Thr Val Leu Leu Thr Pro Arg Lys Lys Arg Pro Ser Tyr Leu
 15 385 390 395 400

gac aaa gta atc gac ctt cca cct aca cat aag cca ccc cct gta tat 1248
 Asp Lys Val Ile Asp Leu Pro Pro Thr His Lys Pro Pro Pro Val Tyr
 405 410 415

20 gaa gaa cga att cct tct ctc cct cag aaa gac ctt ctt ggc cag gta 1296
 Glu Glu Arg Ile Pro Ser Leu Pro Gln Lys Asp Leu Leu Gly Gln Val
 420 425 430

25 cgt gct ctc gaa gac act taa 1317
 Arg Ala Leu Glu Asp Thr
 435

<210> 6

<211> 438

<212> PRT

5 <213> Mouse

<400> 6

```

Met Ala Arg Thr Pro Gly Pro Ala Pro Leu Cys Pro Gly Gly Gly Lys
  1             5             10             15
10 Ala Gln Leu Ser Ser Ala Phe Pro Pro Ala Ala Gly Leu Leu Leu Pro
      20             25             30
Ala Pro Thr Pro Pro Pro Leu Leu Leu Leu Leu Ile Pro Leu Leu Leu
      35             40             45
Phe Ser Arg Leu Cys Gly Ala Leu Ala Gly Ser Ile Ile Val Glu Pro
15      50             55             60
His Val Thr Ala Val Trp Gly Lys Asn Val Ser Leu Lys Cys Leu Ile
      65             70             75             80
Glu Val Asn Glu Thr Ile Thr Gln Ile Ser Trp Glu Lys Ile His Gly
      85             90             95
20 Lys Ser Thr Gln Thr Val Ala Val His His Pro Gln Tyr Gly Phe Ser
      100            105            110
Val Gln Gly Asp Tyr Gln Gly Arg Val Leu Phe Lys Asn Tyr Ser Leu
      115            120            125
Asn Asp Ala Thr Ile Thr Leu His Asn Ile Gly Phe Ser Asp Ser Gly
25      130            135            140
Lys Tyr Ile Cys Lys Ala Val Thr Phe Pro Leu Gly Asn Ala Gln Ser
      145            150            155            160
Ser Thr Thr Val Thr Val Leu Val Glu Pro Thr Val Ser Leu Ile Lys

```

	165	170	175
	Gly Pro Asp Ser Leu Ile Asp Gly Gly Asn Glu Thr Val Ala Ala Val		
	180	185	190
	Cys Val Ala Ala Thr Gly Lys Pro Val Ala Gln Ile Asp Trp Glu Gly		
5	195	200	205
	Asp Leu Gly Glu Met Glu Ser Ser Thr Thr Ser Phe Pro Asn Glu Thr		
	210	215	220
	Ala Thr Ile Val Ser Gln Tyr Lys Leu Phe Pro Thr Arg Phe Ala Arg		
	225	230	235
10	Gly Arg Arg Ile Thr Cys Val Val Lys His Pro Ala Leu Glu Lys Asp		
	245	250	255
	Ile Arg Tyr Ser Phe Ile Leu Asp Ile Gln Tyr Ala Pro Glu Val Ser		
	260	265	270
	Val Thr Gly Tyr Asp Gly Asn Trp Phe Val Gly Arg Lys Gly Val Asn		
15	275	280	285
	Leu Lys Cys Asn Ala Asp Ala Asn Pro Pro Pro Phe Lys Ser Val Trp		
	290	295	300
	Ser Arg Leu Asp Gly Gln Trp Pro Asp Gly Leu Leu Ala Ser Asp Asn		
	305	310	315
20	Thr Leu His Phe Val His Pro Leu Thr Val Asn Tyr Ser Gly Val Tyr		
	325	330	335
	Val Cys Lys Val Ser Asn Ser Leu Gly Gln Arg Ser Asp Gln Lys Val		
	340	345	350
	Ile Tyr Ile Ser Asp Ile Pro Leu Thr Gln Thr Ser Ser Ile Ala Val		
25	355	360	365
	Ala Gly Ala Val Ile Gly Ala Val Leu Ala Leu Phe Ile Ile Thr Val		
	370	375	380
	Phe Val Thr Val Leu Leu Thr Pro Arg Lys Lys Arg Pro Ser Tyr Leu		

385 390 395 400
Asp Lys Val Ile Asp Leu Pro Pro Thr His Lys Pro Pro Pro Val Tyr
 405 410 415
Glu Glu Arg Ile Pro Ser Leu Pro Gln Lys Asp Leu Leu Gly Gln Val
5 420 425 430
Arg Ala Leu Glu Asp Thr
 435

10

<210> 7
<211> 2178
<212> DNA
<213> Mouse

15

<220>
<221> CDS
<222> (197)..(1846)

20 <300>

<301> Satoh-Horikawa K. et al.

<302> Nectin-3, a new member of immunoglobulin-like cell adhesion molecules that shows
homophilic and heterophilic cell-cell adhesion activities.

<303> J. Biol. Chem.

25 <304> 275

<305> 14

<306> 10291-10299 -

<307> 2000-04-07

<308> GenBank accession No. AF195833

<309> 2000-04-13

<400> 7

5 gaattcggca cgagcgacgg cggagtcgag gcagccgcga gcgctcggcc gagtggcggc 60

ggcgcgcgac ggcgcaggag ccgggggttg aggacacgcg cgctggccct tcgcgcgcgc 120

ggccgccgcc gccgcgcga ccagagcct gaggcgccgg ggcgcgcgcg agcgggtggg 180

10

ccggggcaag gcgggc atg gcg cgg acc cgg ggc cgg gcc cgg ttg tgt cct 232

Met Ala Arg Thr Pro Gly Pro Ala Pro Leu Cys Pro

1

5

10

15 gga ggc ggc aaa gca caa ctt tcc tcg gcg ttt cct ccc gcg gcc gga 280

Gly Gly Gly Lys Ala Gln Leu Ser Ser Ala Phe Pro Pro Ala Ala Gly

15

20

25

ctg ctg ctg ccg gcc ccg acg ccg ccg ccg ctg ctg ctg ctg ctt att 328

20 Leu Leu Leu Pro Ala Pro Thr Pro Pro Pro Leu Leu Leu Leu Ile

30

35

40

ccc ctg ctt ctc ttc tcc cgg ctc tgt ggt gcc tta gct gga tca att 376

Pro Leu Leu Leu Phe Ser Arg Leu Cys Gly Ala Leu Ala Gly Ser Ile

25

45

50

55

60

att gtg gag cca cat gtc aca gca gtg tgg gga aag aat gtt tca ttg 424

Ile Val Glu Pro His Val Thr Ala Val Trp Gly Lys Asn Val Ser Leu

	65	70	75	
	aag tgt tta att gaa gtg aat gaa act ata acc cag atc tca tgg gag			472
	Lys Cys Leu Ile Glu Val Asn Glu Thr Ile Thr Gln Ile Ser Trp Glu			
5	80	85	90	
	aag ata cat ggc aaa agt aca cag act gtt gca gtt cat cat cct cag			520
	Lys Ile His Gly Lys Ser Thr Gln Thr Val Ala Val His His Pro Gln			
	95	100	105	
10				
	tat gga ttc tct gtt caa gga gat tat cag gga aga gtc ttg ttt aaa			568
	Tyr Gly Phe Ser Val Gln Gly Asp Tyr Gln Gly Arg Val Leu Phe Lys			
	110	115	120	
15	aac tat tca ctt aat gat gca aca att act ctg cat aac ata ggc ttc			616
	Asn Tyr Ser Leu Asn Asp Ala Thr Ile Thr Leu His Asn Ile Gly Phe			
	125	130	135	140
	tca gat tct gga aaa tat ata tgc aaa gcc gtt aca ttc cca ctt gga			664
20	Ser Asp Ser Gly Lys Tyr Ile Cys Lys Ala Val Thr Phe Pro Leu Gly			
	145	150	155	
	aat gct cag tcc tct aca aca gtg act gtg tta gtt gaa ccc aca gtg			712
	Asn Ala Gln Ser Ser Thr Thr Val Thr Val Leu Val Glu Pro Thr Val			
25	160	165	170	
	agc ctg ata aaa ggg ccg gat tct tta att gat gga ggg aat gag aca			760
	Ser Leu Ile Lys Gly Pro Asp Ser Leu Ile Asp Gly Gly Asn Glu Thr			

	175	180	185	
	gta gca gcc gtt tgt gta gca gcc act gga aag cca gtc gca cag att			808
	Val Ala Ala Val Cys Val Ala Ala Thr Gly Lys Pro Val Ala Gln Ile			
5	190	195	200	
	gac tgg gaa ggt gat ctt ggt gaa atg gaa tct agt aca act tct ttt			856
	Asp Trp Glu Gly Asp Leu Gly Glu Met Glu Ser Ser Thr Thr Ser Phe			
	205	210	215	220
10				
	cct aat gaa aca gca acg att gtc agc caa tac aag ctg ttt ccc aca			904
	Pro Asn Glu Thr Ala Thr Ile Val Ser Gln Tyr Lys Leu Phe Pro Thr			
	225	230	235	
15	aga ttt got cga gga agg cga att act tgt gtt gta aaa cat cca gcc			952
	Arg Phe Ala Arg Gly Arg Arg Ile Thr Cys Val Val Lys His Pro Ala			
	240	245	250	
	tta gaa aag gac att cgc tac tot tto ata cta gac ata cag tat got			1000
20	Leu Glu Lys Asp Ile Arg Tyr Ser Phe Ile Leu Asp Ile Gln Tyr Ala			
	255	260	265	
	cct gaa gtt tca gta aca gga tat gat gga aat tgg ttc gtg gga aga			1048
	Pro Glu Val Ser Val Thr Gly Tyr Asp Gly Asn Trp Phe Val Gly Arg			
25	270	275	280	
	aaa ggt gtt aac ctc aag tgt aat got gat gca aac cct cca ccc ttc			1096
	Lys Gly Val Asn Leu Lys Cys Asn Ala Asp Ala Asn Pro Pro Pro Phe			

285	290	295	300	
aag tcc gtg tgg agc agg ttg gat gga caa tgg cct gat ggt tta ttg 1144				
Lys Ser Val Trp Ser Arg Leu Asp Gly Gln Trp Pro Asp Gly Leu Leu				
5	305	310	315	
gog tca gat aat act ctt cat ttt gtc cat cca ttg act gtc aat tat 1192				
Ala Ser Asp Asn Thr Leu His Phe Val His Pro Leu Thr Val Asn Tyr				
	320	325	330	
10				
tct ggc gtt tat gtc tgt aaa gta tca aat tcc ctt ggt caa aga agt 1240				
Ser Gly Val Tyr Val Cys Lys Val Ser Asn Ser Leu Gly Gln Arg Ser				
	335	340	345	
15				
gat caa aag gtt atc tac att tca gat cct cct acc acc acc acc ctt 1288				
Asp Gln Lys Val Ile Tyr Ile Ser Asp Pro Pro Thr Thr Thr Thr Leu				
	350	355	360	
cag ccg aca gtt cag tgg cat tcc tca cct gct gac gtc cag gat ata 1336				
20				
Gln Pro Thr Val Gln Trp His Ser Ser Pro Ala Asp Val Gln Asp Ile				
	365	370	375	380
gca aca gag cat aaa aaa ttg ccc ttt cct ttg tca act ttg gca aca 1384				
Ala Thr Glu His Lys Lys Leu Pro Phe Pro Leu Ser Thr Leu Ala Thr				
25	385	390	395	
ctt aag gat gac aca att ggc acc atc att gct agt gta gtg ggt ggg 1432				
Leu Lys Asp Asp Thr Ile Gly Thr Ile Ile Ala Ser Val Val Gly Gly				

	400	405	410	
	gct ctc ttc tta gtg ctt gtg agc att tta gct ggg gta ttc tgc tat			1480
	Ala Leu Phe Leu Val Leu Val Ser Ile Leu Ala Gly Val Phe Cys Tyr			
5	415	420	425	
	agg aga cga cgg acg ttt cgt gga gac tac ttt gcc aaa aac tac att			1528
	Arg Arg Arg Arg Thr Phe Arg Gly Asp Tyr Phe Ala Lys Asn Tyr Ile			
	430	435	440	
10	cca cca tca gac atg cag aaa gaa tca cag att gat gtt ctt cac cag			1576
	Pro Pro Ser Asp Met Gln Lys Glu Ser Gln Ile Asp Val Leu His Gln			
	445	450	455	460
15	gat gag ctg gat tct tac cca gac agt gta aaa aag gaa aac aaa aat			1624
	Asp Glu Leu Asp Ser Tyr Pro Asp Ser Val Lys Lys Glu Asn Lys Asn			
	465	470	475	
	cca gta aac aac ctg atc cgc aaa gac tac tta gag gag cct gag aaa			1672
20	Pro Val Asn Asn Leu Ile Arg Lys Asp Tyr Leu Glu Glu Pro Glu Lys			
	480	485	490	
	act cag tgg aat aat gta gag aac ctc act agg ttt gaa aga ccg atg			1720
	Thr Gln Trp Asn Asn Val Glu Asn Leu Thr Arg Phe Glu Arg Pro Met			
25	495	500	505	
	gat tac tat gaa gat cta aaa atg gga atg aag ttt gtc agt gat gaa			1768
	Asp Tyr Tyr Glu Asp Leu Lys Met Gly Met Lys Phe Val Ser Asp Glu			

510 515 520

cgc tac aat gaa agt gaa gat ggt ttg gtt tct cat gta gat ggc tcc 1816
Arg Tyr Asn Glu Ser Glu Asp Gly Leu Val Ser His Val Asp Gly Ser

5 525 530 535 540

gta att tcc agg agg gag tgg tat gtc taa cagccactga cgcgaattca 1866
Val Ile Ser Arg Arg Glu Trp Tyr Val

 545 550

10

otatgtacaa ggtttcattc acactagttg accattttca gattgttcat actttttcct 1926

gaggaagaat aagctttttc aagttgattt cgagcttact ttttatatto tgatctgaca 1986

15 aatgaaaatg taaaacctgg gttcaatgta tctgagctgc ttacagttt tcaactgtat 2046

actactgtct caagatttaa attctaattgc agagtacttt attggtctga ggcacacagg 2106

taagaaagat gtcaacgtta aatgtatgac gtttttggtta caaaaattaa aaaaaaaaaa 2166

20

aaaaaactcg ag 2178

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/01871

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12N 15/12, C07K 14/78, C07K 16/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12N 15/12, C07K 14/78, C07K 16/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN), Genbank/EMBL/DBSJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Takahashi K. et al. "an immunoglobulin-like cell adhesion molecule recruited to cadherin-based adherens junctions through interaction with Afadin, a PDZ domain-containing protein" J Cell Biol (1999), Vol.145, No.3, p.539-49	1-9
A	Miyahara M. et al. "Interaction of nection with afadin is necessary for its clustering at cell-cell contact sites but not for its cis dimerization or trans interaction" J Biol Chem (2000), Vol.275, No.1, p.613-8	1-9
A	Asakura T et al. "Similar and differential behaviour between the nection-afadin-ponsin and cadherin-catenin systems during the formation and disruption of the polarized junctional alignment in epithelial cells" Genes Cells (1999), Vol.4, NO.10, p.573-81	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27 April, 2001 (27.04.01)Date of mailing of the international search report
15 May, 2001 (15.05.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO1/01871

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ C12N 15/12, C07K 14/78, C07K 16/18		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ C12N 15/12, C07K 14/78, C07K 16/18		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN), Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Takahashi K. et al. "an immunoglobulin-like cell adhesion molecule recruited to cadherin-based adherens junctions through interaction with Afadin, a PDZ domain-containing protein" J Cell Biol(1999), Vol.145, No. 3, p. 539-49	1-9
A	Miyahara M. et al. "Interaction of nection with afadin is necessary for its clustering at cell-cell contact sites but not for its cis dimerization or trans interaction" J Biol Chem(2000), Vol.275, No.1, p. 613-8	1-9
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 27.04.01	国際調査報告の発送日 5.05.01	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 上條 肇	4N 9839
電話番号 03-3581-1101 内線 3488		

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Asakura T et al. "Similar and differential behaviour between the nection-afadin-ponsin and cadherin-catenin systems during the formation and disruption of the polarized junctional alignment in epithelial cells" Genes Cells(1999), Vol.4, NO.10, p.573-81	1-9